

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biologia cellulare, molecolare e industriale: Progetto
n. 3 “Microbiologia e biotecnologie industriali”

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: CHIM11

TITOLO TESI

***PRETRATTAMENTI TERMO-MECCANICI ED
ENZIMATICI SU SCARTI DELL'INDUSTRIA
ENOLOGICA PER LA PRODUZIONE DI
BIOGAS***

Presentata da: Bracchitta Mirko

Coordinatore Dottorato

Alejandro Hochkoepler

Relatore

Leonardo Setti

Esame finale anno 2012

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	1
Il concetto di bioindustria nel settore delle moderne biotecnologie applicato al settore dell'energia.....	1
Biocarburanti.....	5
Ruolo dei biocarburanti nelle politiche comunitarie.....	6
Valorizzazione energetica di scarti dell'industria agro-alimentare mediante un approccio di biorefinery.....	7
Biogas come vettore energetico polivalente.....	12
<i>Fasi della digestione anaerobica nella produzione di biogas.....</i>	<i>14</i>
<i>Fase di idrolisi.....</i>	<i>15</i>
<i>Fase di acidogenesi.....</i>	<i>15</i>
<i>Fase di acetogenesi.....</i>	<i>16</i>
<i>Fase di metanogenesi.....</i>	<i>17</i>
Produzione potenziale di biogas da vari componenti delle biomasse.....	18
Composizione chimica e struttura delle biomasse ligno-cellulosiche.....	19
<i>Carboidrati.....</i>	<i>20</i>
<i>Lignina.....</i>	<i>24</i>
Pre-trattamenti dei substrati ligno-cellulosici.....	27
Pre-trattamenti meccanico-fisici.....	28
<i>Estrusione.....</i>	<i>29</i>
<i>Ultrasuoni.....</i>	<i>29</i>
Pre-trattamenti termici.....	29
Pre-trattamenti chimici.....	30
<i>Trattamenti con acidi.....</i>	<i>30</i>
<i>Trattamenti con basi.....</i>	<i>30</i>
Pre-trattamenti biologici.....	31
Pre-trattamenti enzimatici.....	31
<i>Cellulasi.....</i>	<i>31</i>
<i>Amilasi.....</i>	<i>33</i>
<i>Xilanasi.....</i>	<i>34</i>
<i>Pectinasi.....</i>	<i>35</i>
<i>Laccasi.....</i>	<i>36</i>
<i>Perossidasi.....</i>	<i>38</i>
Fermentazioni fungine.....	39

2. PARTE SPERIMENTALE.....	41
Scarti agroalimentari solidi dell'industria cerealicola.....	41
Scarti agroalimentari solidi dell'industria enologica.....	43
Pre-trattamenti su scarti ligno-cellulosici.....	47
<i>Pre-trattamenti termo-meccanici.....</i>	<i>47</i>
<i>Pre-trattamenti enzimatici.....</i>	<i>50</i>
Screening e caratterizzazione di prodotti enzimatici commerciali.....	51
<i>Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del prodotto commerciale Novozymes.....</i>	<i>51</i>
<i>Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del prodotto commerciale Genencor.....</i>	<i>57</i>
Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria cerealicola.....	67
<i>Valutazione preliminare del trattamento enzimatico su paglia estrusa.....</i>	<i>67</i>
<i>Trattamenti termo-meccanici ed enzimatici combinati su paglia estrusa.....</i>	<i>68</i>
Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria enologica.....	74
<i>Caratterizzazione dei graspi utilizzati per le prove sperimentali.....</i>	<i>74</i>
<i>Trattamenti termici, meccanici ed enzimatici combinati su graspi d'uva...</i>	<i>75</i>
Coltura in fase sommersa di <i>Pleurotus ostreatus</i> e valutazione dell'attività laccasica.....	81
Test d'idrolisi enzimatica su residui dell'industria enologica e cerealicola dopo differenti pre-trattamenti.....	85
<i>Test idrolitici su vinacce.....</i>	<i>85</i>
<i>Test idroliti su graspi d'uva.....</i>	<i>88</i>
<i>Test idrolitici su paglia.....</i>	<i>90</i>
<i>Test di fermentazione su residui dell'industria enologica e cerealicola idrolizzati.....</i>	<i>92</i>
<i>Fermentazione batch di idrolizzati di vinacce.....</i>	<i>92</i>
<i>Fermentazione batch di idrolizzati di graspi d'uva.....</i>	<i>93</i>

<i>Fermentazione batch di idrolizzati di paglia</i>	94
Confronto energetico tra sottoprodotti idrolizzati e matrici comunemente utilizzate per la produzione di biogas.....	96
Conservazione di graspi d'uva in condizioni anossiche	97
<i>Test di fermentazione su graspi d'uva conservati in condizioni anossiche</i>	99
3. CONCLUSIONI	101
4. MATERIALI E METODI	105
Pre-trattamenti su scarti ligno-cellulosici	105
Screening e caratterizzazione di prodotti enzimatici commerciali.....	105
<i>Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo di Baley)</i>	105
<i>Attività amilasica</i>	106
<i>Attività xilanasica</i>	107
<i>Attività pectinasica</i>	108
<i>Determinazione dell'attività xilanasica del preparati enzimatico Accelerase 1500 a diverse temperature</i>	109
Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria cerealicola	110
<i>Valutazione preliminare del trattamento enzimatico su paglia estrusa</i>	110
Coltura in fase sommersa di <i>Pleurotus ostreatus</i> e valutazione dell'attività laccasica	111
<i>Coltura di <i>Pleurotus ostreatus</i> su terreno solido</i>	112
<i>Determinazione dell'attività laccasica</i>	112
Test d'idrolisi enzimatica residui dell'industria enologica e cerealicola dopo differenti pre-trattamenti	113
<i>Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)</i>	114

Conservazione di graspi d'uva in condizioni anossiche.....	116
<i>Test di fermentazione su graspi d'uva sottoposti a conservazione anossica.....</i>	117
5. BIBLIOGRAFIA.....	118

1. INTRODUZIONE

Il concetto di bioindustria nel settore delle moderne biotecnologie applicato al settore dell'energia

Per cogliere a fondo il significato innovativo delle moderne biotecnologie bisogna raffrontarlo alle problematiche della bioindustria, il comparto produttivo che utilizza organismi biologici o loro componenti attivi quali agenti di trasformazione o di riconoscimento molecolare.

I settori della bioindustria sono molto diversificati: vanno dai prodotti farmaceutici e diagnostici ai prodotti per l'industria alimentare, dai prodotti per l'industria chimica ai processi e prodotti per il monitoraggio ed il trattamento riabilitativo dell'ambiente e comprendono anche il settore dell'energia. Il comparto produttivo risulta quindi molto ampio e diversificato, legato dalla comune utilizzazione di organismi biologici o di loro componenti attivi come agenti di trasformazione o come sistemi di riconoscimento molecolare. Il fattore principale di accelerazione della bioindustria è dato dalla innovazione biotecnologica poichè le nuove tecnologie hanno aumentato fortemente la progettualità ed il controllo dei bioprocessi ed hanno consentito di produrre nuovi prodotti di grande specificità d'uso. Le potenti forze che sostengono l'affermarsi dell'innovazione biotecnologica nella bioindustria sono diverse e convergenti. La biotecnologia offre all'industria chimica la possibilità di utilizzare come materie prime biomasse rinnovabili e di sviluppare nuovi processi per la produzione di prodotti sia della chimica fine che di base. La maggiore ecocompatibilità dei processi biotecnologici rispetto a quelli chimici tradizionali fornisce un ulteriore elemento di interesse.

Lo sviluppo dell'industria chimica ha avuto inizio intorno al 1870 con la produzione di coloranti artificiali e con lo sviluppo di tecniche analitiche che hanno consentito la separazione di miscele complesse, provenienti ad esempio da estratti di piante medicinali. Parallelamente Pasteur e collaboratori portavano avanti le conoscenze microbiologiche, evidenziando il ruolo dei microrganismi in numerosi processi infettivi e nelle trasformazioni fermentative di diversi materiali e così le fermentazioni sono diventate via via più competitive, sia per il progressivo aumento del costo delle materie prime utilizzabili, sia per la necessità di produrre sostanze molto complesse difficilmente ottenibili per via chimica. La maggior parte dei microrganismi impiegati nelle fermentazioni utilizzano zuccheri complessi o glucosio, ad esso facilmente riconducibili come fonte di energia e carbonio per la crescita. Di fronte all'eccedenza

dei prodotti agricoli si pone il problema di verificare se questi possano avere un impatto commerciale significativo anche in settori diversi da quello alimentare. Questi prodotti sono costituiti essenzialmente da fonti di carbonio fermentabile e possono venire degradati metabolicamente e trasformati in molecole organiche di interesse o in vettori energetici che possano facilmente rilasciare energia (come nel caso dei biocombustibili solidi, liquidi o gassosi), che si prestano peraltro ad essere trasportati fino al luogo di utilizzazione (figura 1.1)

Mercato	Tipo di prodotto	Impatto sulla produzione agricola
Chimica fine	Antibiotici, vitamine, aspartame, enzimi	Nessuno
	Aminoacidi, isolati proteici, glutine, fruttosio, biopolimeri	Debole, salvo che per il fruttosio (mais ed eventualmente frumento)
Chimica di base	Zucchero, alcoli, acidi, solventi	Medio
Energia	Etanolo, metano	Da forte (etanolo) a nessuno (metano)

Fig 1.1 *Prodotti della bioindustria*

Biocarburanti

Poche fonti energetiche oggi disponibili (fonti fossili come petrolio, gas naturale, carbone, o fonti rinnovabili, come l'energia solare, eolica, idrica, ecc.) sono capaci di soddisfare le diverse necessità della società, ad esempio quella della mobilità e dei trasporti. Diventa quindi necessario introdurre forme di energia che possano garantire un miglior collegamento tra la disponibilità di fonti energetiche e la specifica utilizzazione richiesta: in questo contesto i vettori energetici giocano il loro ruolo peculiare.

Il vettore energetico è una forma di energia secondaria che si presta a essere trasportata, mediante apposite reti, fino al luogo di utilizzazione ed è costituito da una sostanza trasportabile che possa facilmente rilasciare l'energia in essa contenuta (come nel caso dei combustibili solidi, liquidi o gassosi, il vapore, l'acqua calda, ecc.) o anche dall'elettricità.

Le diverse fasi che sono coinvolte, dalla generazione all'uso finale di un vettore energetico, ne costituiscono il "ciclo di vita" in cui le operazioni fondamentali da effettuare in questo ciclo sono:

- a) generazione a partire dalla fonte primaria;
- b) trasporto;

- c) stoccaggio (quando richiesto);
- d) distribuzione;
- e) impiego finale con conseguente impatto sull'ambiente, sia in termini di emissioni, sia in termini di efficienza della conservazione dell'energia originariamente contenuta nella fonte primaria (lungo tutto il ciclo di trasformazione, sia nel processo di produzione del vettore, che nel suo impiego finale).

La connessione delle fonti energetiche al mercato comporta innanzitutto scelte sulla natura delle fonti ma anche scelte tecnologiche e strategiche per quanto riguarda i processi per produrre i vettori, la logistica delle fonti e dei vettori, gli usi finali, e certo non ultima, l'efficienza energetica complessiva.

I vettori si distinguono anche per la diversa forma fisica: gassosa per metano e idrogeno; gas liquefatto per GPL (Gas di Petrolio Liquefatto) o biocombustibili come il biometano; liquida per tutti i derivati del petrolio e biocombustibili liquidi; solida per alcuni altri combustibili.

Qui il termine biocombustibile (o biocarburante) definisce i combustibili che derivano dalle biomasse e presentano caratteristiche chimico-fisiche tali da renderli utilizzabili in processi di combustione o altra trasformazione termochimica (*Gazzetta ufficiale*, 2000). Attualmente la produzione di biocarburanti avviene sfruttando la biomassa, termine comune che viene usato per identificare la materia organica vegetale e che viene più specificatamente definita in Italia dal decreto legislativo 29/12/03 n.387 come:

“la parte biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali) e dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani”.

La biomassa utilizzabile ai fini energetici consiste quindi nei materiali organici che, tramite trasformazione, possono essere utilizzati come combustibili solidi, liquidi o gassosi. Possono essere considerate biomasse sostanze molto eterogenee come le colture tradizionalmente coltivate per scopi energetici, scarti delle lavorazioni agricole, dell'allevamento e dell'industria, residui forestali, rifiuti urbani civili e industriali (umidi e secchi), legname da ardere, reflui degli allevamenti e i sottoprodotti derivanti dai processi di lavorazione agro-industriale destinati all'alimentazione umana.

La biomassa, opportunamente trasformata, può avere molteplici impieghi:

- conversione in energia elettrica o termica;
- usi non energetici per l'industria e l'agricoltura: fibre tessili, fertilizzanti, cellulosa/carta.

- produzione di biocarburanti (es. bioetanolo e biogas)

Per utilizzare la biomassa per il settore dei trasporti ai fini energetici (figura 1.2), è necessario un processo bio-chimico, che ricava energia per reazione chimica dovuta al contributo di enzimi e microrganismi, quali la fermentazione alcolica (bioetanolo) e la fermentazione anaerobica (biogas)

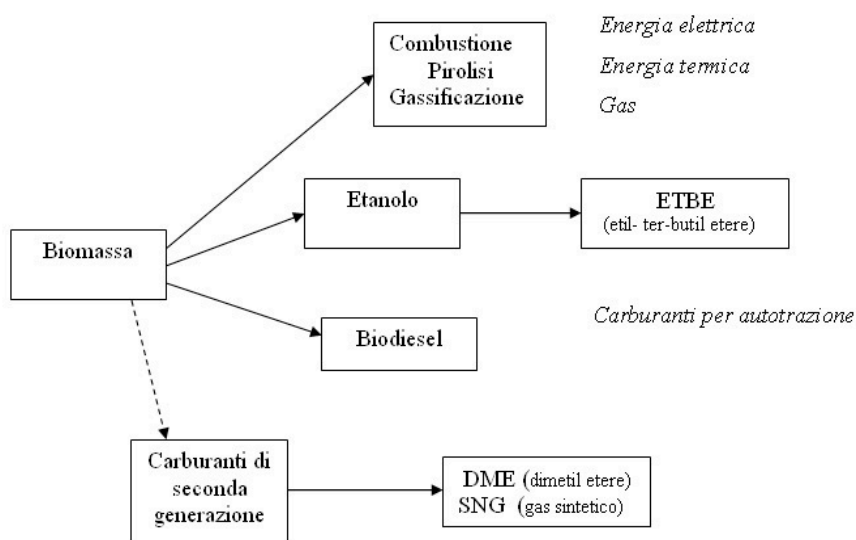


Fig 1.2 Esempio di alcuni impieghi energetici delle biomasse

Tradizionalmente l'impiego di biocarburanti è legato al settore dei trasporti, in sostituzione dei combustibili fossili, ma rispetto all'utilizzo classico, nel corso degli ultimi anni si è assistito a una rapida espansione del campo di applicazione dei biocarburanti da utilizzare per la cogenerazione e quindi alla produzione contemporanea dei vettori energetici quali energia elettrica e termica.

In base allo stato di conoscenza e avanzamento delle tecnologie di produzione si classificano i biocarburanti in due macro categorie:

Biocarburanti di prima generazione: rientrano in questa categoria biodiesel, bioetanolo prodotto da materie prime zuccherine e il biogas, ovvero prodotti in cui le tecnologie di produzione sono ampiamente conosciute, la cui applicazione e produzione sono utilizzate da tempo e in cui vi sono ampi margini di miglioramento nei costi di produzione e nell'ottimizzazione del bilancio energetico.

Biocarburanti di seconda generazione: sono accomunati dalla possibilità di essere prodotti a partire da biomasse ligno-cellulosiche come materia grezza, con costi di

reperimento molto bassi o addirittura nulli ma la cui produzione risiede in tecnologie non del tutto ottimizzate. Sono considerati biocombustibili molto promettenti perché sono uno strumento valido per la riduzione dei costi di produzione dei biocarburanti.

Ruolo dei biocarburanti nelle politiche comunitarie

L'argomento riguardante i biocarburanti ha assunto un interesse particolarmente rilevante soprattutto negli ultimi anni per diversi motivi:

1. Il forte aumento della domanda energetica mondiale, che rende improponibile un ulteriore aumento dei combustibili fossili;
2. L'aumento del prezzo del petrolio, con evidenti ripercussioni sul prezzo dei combustibili fossili derivati;
3. La spinta sociale dei Paesi più industrializzati alla produzione di energia a minor impatto ambientale;
4. Instabilità politica dei principali Paesi produttori di gas e petrolio
5. Cambiamenti climatici, anche provocati dall'impiego di combustibili;

L'ultimo punto è sicuramente quello che ha messo in risalto tutte le tematiche che oggi si muovono attorno all'utilizzo di biocarburanti.

L'aumento dell'attività antropica, che coincide con le rivoluzioni industriali, ha portato negli ultimi secoli ad un aumento dei principali gas serra responsabili del cambiamento climatico del nostro pianeta ¹(figura 1.3), portando i segnali di cambiamento climatico ad offrire diverse preoccupazioni per il futuro del pianeta.

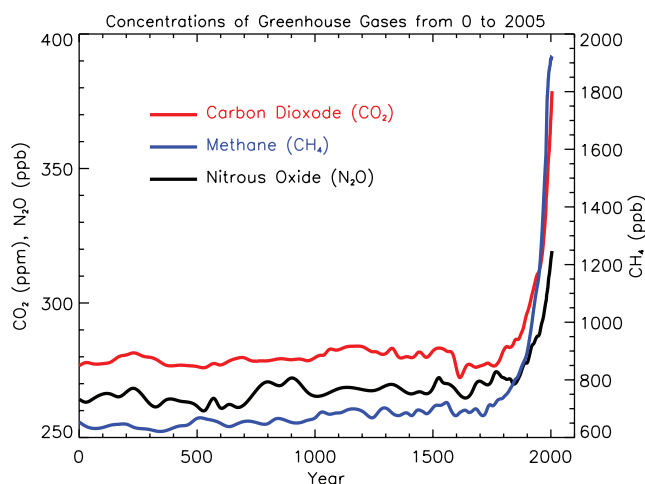


Fig. 1.3 Concentrazione atmosferica di importanti gas ad effetto serra negli ultimi due millenni

Le emissioni di anidride carbonica dai primi anni 70 al 2004 sono aumentate di oltre il 70%, principalmente a causa dell'utilizzo di combustibili fossili (*Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007*) (figura 1.4), e in misura minore, dai cambiamenti nell'utilizzo del suolo².

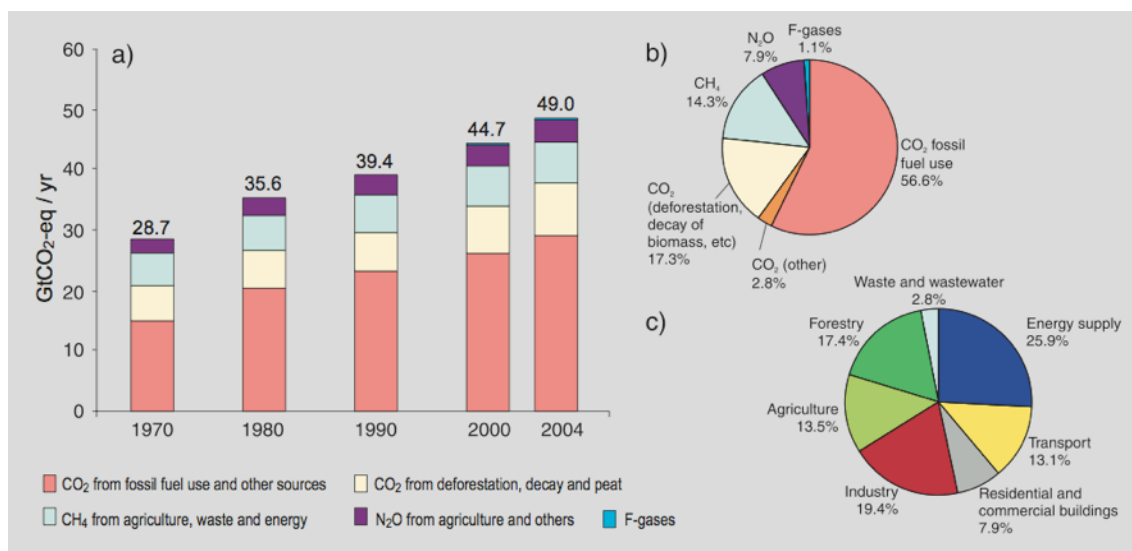


Fig 1.4 Emissioni globali di gas ad effetto serra dal 1970 al 2004

L'innalzamento della temperatura globale è ancor più preoccupante in visione dell'incremento notevole di emissioni che è previsto per i prossimi decenni (*IPCC, 2007*), soprattutto per effetto della imponente crescita economica dei paesi in via di sviluppo come la Cina e l'India, che risulta fortemente legato ad un aumento dei consumi energetici e, conseguentemente, a maggiori emissioni di gas ad effetto serra. Il settore dell'energia è il maggior responsabile delle emissioni di gas-serra, e il consumo di energia primaria è previsto aumentare dell'1,8% l'anno da oggi al 2030 (*IEA, 2007*), per cui la mitigazione dei cambiamenti climatici passa inevitabilmente attraverso un'azione coordinata di modifica del sistema di approvvigionamento energetico, che dovrà dipendere sempre meno da combustibili di origine fossile in favore delle fonti energetiche rinnovabili.

L'Unione Europea è l'unica area geo-politica dove sono stati presi impegni vincolanti di lotta alle emissioni di gas serra dei singoli Stati che fanno parte dell'Unione e per tale motivo ha sottoscritto diversi accordi per la riduzione delle emissioni di anidride carbonica in atmosfera. Attraverso la loro attuazione ogni singolo Stato facente parte

dell'Unione si impegna a ridurre di almeno il 20% le proprie emissioni interne entro il 2020, portando anche le rinnovabili a raggiungere la quota del 20% sulle fonti primarie utilizzate a scopo energetico, e ad incrementare del 20% l'efficienza energetica dei sistemi produttivi.

La riduzione delle emissioni di gas serra quindi, passa attraverso un minor consumo di energia e ad un ricorso maggiore a fonti di energia rinnovabili. Per il raggiungimento di tali obiettivi occorre intervenire sui tre settori maggiormente coinvolti nell'utilizzo di fonti energetiche:

- la produzione di energia elettrica: aumentando la produzione di elettricità da fonti rinnovabili
- il consumo di combustibili per autotrazione: aumentando l'uso di biocarburanti, che nel 2020 dovranno rappresentare il 10% dei combustibili totali utilizzati;
- impianti di riscaldamento e condizionamento: incrementandone l'efficienza e riducendone i consumi.

Valorizzazione energetica di scarti dell'industria agro-alimentare mediante un approccio di biorefinery

Le tematiche energetiche Comunitarie attuali hanno portato in primo piano settori come quello agricolo e alimentare come settori strategici per differenziare le attività produttive e di reddito in un contesto come quello Europeo. Ciò porta alla definizione di filiere agro-energetiche organizzate che richiedono valutazioni in merito al loro impatto ambientale e di benefici più diffusi a livello territoriale attraverso analisi di costi/benefici e di input/output di ciascuna filiera. Una singola azienda può ad esempio destinare parte delle proprie produzioni ad un uso puramente energetico mantenendo una parte per gli usi più tradizionali. Ogni filiera produttiva creata sarà così in grado di produrre energia da fonti rinnovabili e contribuire al raggiungimento degli obiettivi imposti dalle politiche comunitarie.

In una concezione di filiera agro-energetica occorre ottimizzare e rendere efficienti vari fattori organizzativi che vanno dalla produzione e reperimento della biomassa fino alla trasformazione finale in energia. A tal fine è opportuno programmare l'uso del territorio per valutare la disponibilità di biomassa che il territorio è in grado di assicurare e in secondo luogo occorre localizzare e dimensionare gli impianti di produzione energetica in funzione della disponibilità di biomassa da utilizzare. Appare poi altrettanto

importante scegliere la tecnologia di trasformazione energetica in base al tipo di biomassa disponibile tenendo anche presente gli aspetti tecnici e i vincoli dettati dalle normative vigenti.

La realizzazione di una filiera agro-energetica prevede tre fasi principali:

- *fase progettuale*: in questa fase occorre valutare la tipologia e la quantità di biomassa disponibile per poter stabilire la tecnologia di trasformazione energetica migliore da utilizzare. In questa fase è prevista anche una valutazione economico-finanziaria attraverso la stesura di un *business-plan* che indichi la fattibilità economica dell'intera filiera produttiva;
- *fase operativa*: è la fase prettamente esecutiva poiché si ottengono le autorizzazioni necessarie per la realizzazione dell'impianto in cui verrà il processo di conversione e in cui questo viene collaudato al termine della costruzione;
- *fase gestionale*: nella fase di routine operativa si gestisce tutta la filiera operativa, dal reperimento costante delle biomasse durante il ciclo di vita dell'impianto produttivo fino alla gestione dello stesso e dei prodotti residuali che da esso derivano.

In base alla distanza tra l'impianto produttivo e i punti di reperimento della biomassa si possono avere filiere corte o lunghe. Nel primo caso singole aziende o consorzi di più aziende cooperano per il conferimento continuo di biomassa al centro produttivo rappresentato dall'impianto di conversione, rispettando il vincolo di 70 km dall'impianto per l'approvvigionamento di biomasse. Nel caso delle filiere lunghe la provenienza delle biomasse va oltre i 70 km previsti, raggiungendo anche distanze extranazionali.

Un approccio contestuale ad un sistema agro-energetico classicamente concepito, in cui la biomassa ha una destinazione puramente energetica, è l'introduzione nella filiera produttiva di altri sistemi integrati legati all'utilizzo di biomassa. Il modello emergente per il conseguimento di tale risultato è quello della bioraffineria, in cui si affianca al sistema produttivo energetico anche quello di produzione di molecole chimiche, principi attivi o altri composti come biopolimeri che sono destinati all'industria alimentare, mangimistica o chimica. Il concetto di bioraffineria oggi è analogo a quello della raffinazione del petrolio, in cui si produce una moltitudine di prodotti a partire dal petrolio grezzo. A differenza di una raffineria di petrolio, la bioraffineria usa risorse

rinnovabili per produrre chemicals ed energia dai prodotti residui del processo, contribuendo così ad abbassare l'inquinamento ambientale (figura 1.5)

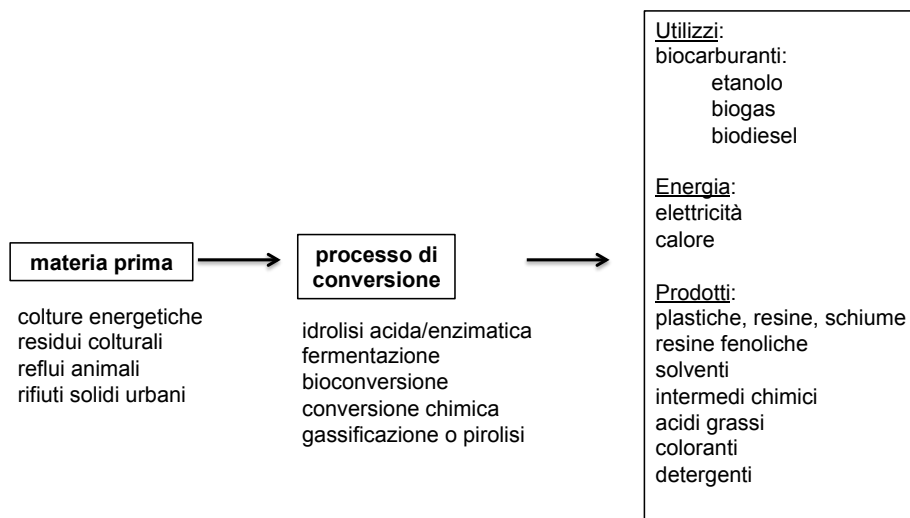


Fig 1.5 Schema semplificato per la descrizione di una bioraffineria³

Il concetto di bioraffineria oggi può essere largamente applicato nella gestione di sottoprodotti dell'industria agro-alimentare che rappresentano un'abbondante fonte di materie prime a basso costo che non sottraggono territorio e risorse necessarie per le comuni produzioni alimentari. La produzione di sottoprodotti agro-alimentari pone molti problemi di carattere economico e ambientale relativamente alle procedure del loro utilizzo e smaltimento.

Oggi in Europa il settore agro-alimentare costituisce uno dei comparti produttivi a cui sono attribuite le più elevate produzioni di rifiuti destinati in larga parte allo smaltimento. A livello Europeo gli scarti agricoli rappresentano un significativo potenziale per lo sviluppo dell'industria bioenergetica e si stimano nell'ordine di 250 milioni di ton/anno⁴. Nell'area del Mediterraneo, gli scarti di maggiore rilevanza sono legati alla lavorazione dei cereali, della vite e delle olive.

Con il termine "cereali" si identificano un gruppo di piante erbacee appartenenti alla famiglia delle Graminacee, dal cui frutto o cariosside si ottengono alimenti e prodotti alimentari di altissima valenza nutrizionale. I principali cereali cosiddetti "a paglia" e di più largo consumo sono oggi il grano tenero, grano duro, orzo, segale, riso, mentre avena e miglio vengono utilizzati prevalentemente per l'alimentazione del bestiame. Tra i cereali prodotti in Italia il mais risulta quello maggiormente coltivato seguito dal frumento (duro e tenero), riso, orzo, avena e segale (figura 1.6)

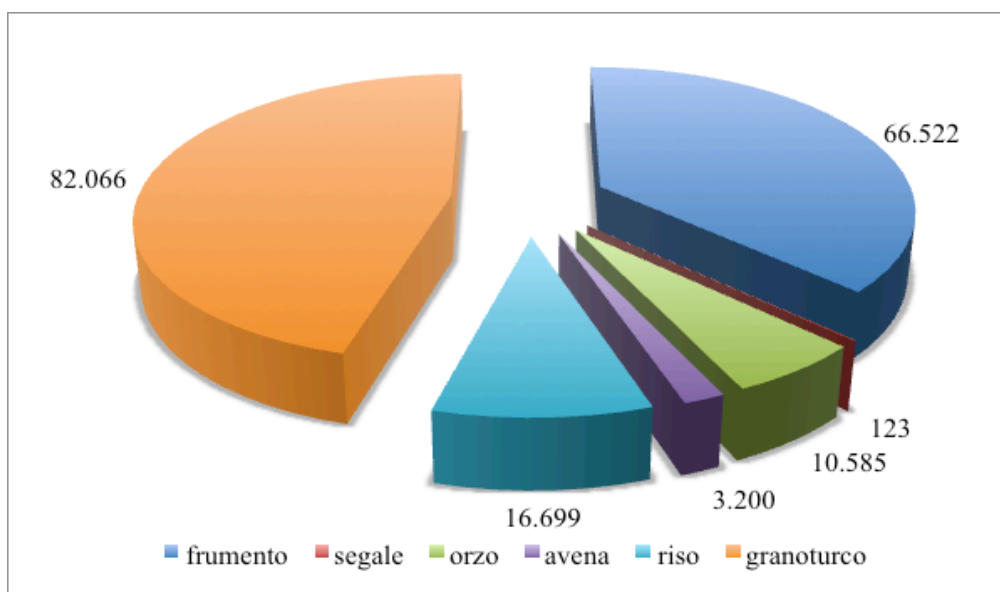


Fig 1.6 Produzioni delle principali coltivazioni cerealicole italiane (dati in migliaia di quintali) (ISTAT 2009)

Nel panorama agro-alimentare dell'industria italiana una posizione preminente è occupata dal comparto di produzione del vino, rappresentando il settore più importante all'interno dell'industria delle bevande. Le superfici italiane destinate infatti alla coltivazione da vite (da tavola e da vino) ammontano infatti a 800.000 ha nel 2009 per una produzione totale di uva pari a 7,8 milioni di tonnellate e 4,5 milioni di ettolitri di vino (fonte ISTAT 2009).

La gestione dei sottoprodotti generati da tali produzioni richiede un approccio di waste management che riesca da un lato a ridurre il loro impatto ambientale e dall'altro a valorizzare economicamente questa tipologia di prodotti. Ciò è possibile attraverso trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale per massimizzare il recupero di valore aggiunto dallo scarto, ottimizzando nello stesso tempo le procedure di smaltimento.

La gestione deve tenere conto anche delle caratteristiche fisiche di questi scarti, poichè questi possono trovarsi in forma liquida o solida e microbiologicamente e chimicamente instabili, ma dipenderà anche delle caratteristiche merceologiche, la loro distribuzione nel territorio e della loro marcata stagionalità. Il sistema di bioraffinazione deve pertanto essere flessibile per assicurare il funzionamento del sistema e adattarsi alle caratteristiche particolari dei vari sottoprodotti con soluzioni tecniche e logistiche che consentano sempre la massima sostenibilità del sistema. Un esempio di gestione organica dei sottoprodotti del settore agro-alimentare è rappresentato nella figura 1.7

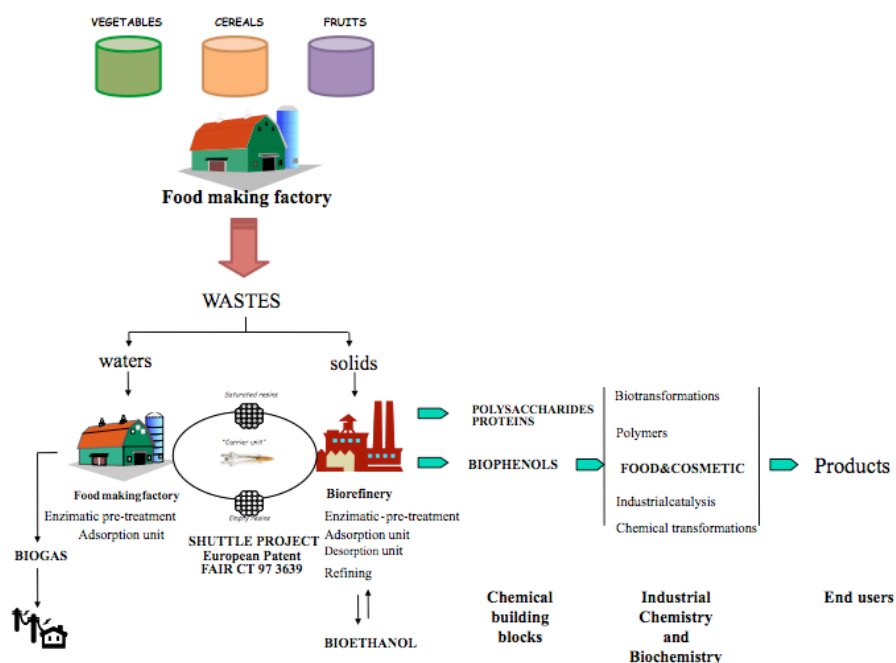


Fig 1.7 Schema di approccio integrato nella valorizzazione chimico energetica di scarti dell'industria agro-alimentare tramite bioraffinazione

Un sistema integrato di valorizzazione di questi sottoprodotti prevede per esempio un primo stadio di disgregazione della matrice vegetale con la liberazione di tutte le componenti chimiche. Successivamente vengono estratti dalla biomassa quelle frazioni chimiche utilizzabili come *secondary chemical building blocks* per la chimica industriale, ovvero prodotti finiti con alto valore aggiunto per l'industria alimentare, farmaceutica o cosmetica. I fenoli separati da rifiuti vegetali, per esempio, sono utilizzabili per la trasformazione in numerosi processi chimici^{5,6}. Il recupero di questi intermedi di produzione consente inoltre di accoppiare la valorizzazione chimica della biomassa con una valorizzazione dal punto di vista energetico, aumentando la fattibilità economica generale dei processi di valorizzazione dei rifiuti. La presenza di composti fenolici per esempio provoca delle interazioni negative con i processi fermentativi coinvolti nella produzione di biocarburanti come bioetanolo e biogas⁷. La loro eliminazione contribuisce quindi a migliorare l'utilizzazione di tali substrati per ottenere rese energetiche più alte⁸.

Biogas come vettore energetico polivalente

Nella definizione più attuale di biocarburanti si è superato il legame con il settore dei trasporti e si dà una maggiore enfasi alla loro eterogeneità delle applicazioni, consentite oggi dall'impiego dei motori endotermici. A sostegno di quest'analisi ricopre un ruolo importante la produzione di biogas, che può essere prodotto da molteplici materie prime e che tradizionalmente deriva dalla fermentazione anaerobica di biomasse vegetali. In seguito all'accresciuta consapevolezza della valenza ambientale dello sfruttamento delle biomasse, si è sviluppato il processo di co-digestione, in cui i substrati di diversa provenienza (per esempio scarti agricoli, liquami zootecnici, reflui agroindustriali, colture dedicate) sono miscelati tra loro per accrescere la stabilità e, quindi, l'efficienza del processo.

L'entrata in vigore dei nuovi decreti attuativi per la cogenerazione da biogas nel 2009, ha creato un forte fermento nel settore, dopo anni d'incertezze legislative. Oggi, un numero sempre maggiore di aziende agricole italiane e soggetti industriali sfruttano i benefici e le opportunità che si aprono in questo settore. Ciò è dimostrato dal numero sempre crescente di impianti dedicati alla produzione di biogas presenti in Italia nel settore agricolo e zootecnico, che sfruttano questo tipo di tecnologia e che negli ultimi 10 anni (figura 1.8) ha visto un forte sviluppo diventando una realtà ormai consolidata.

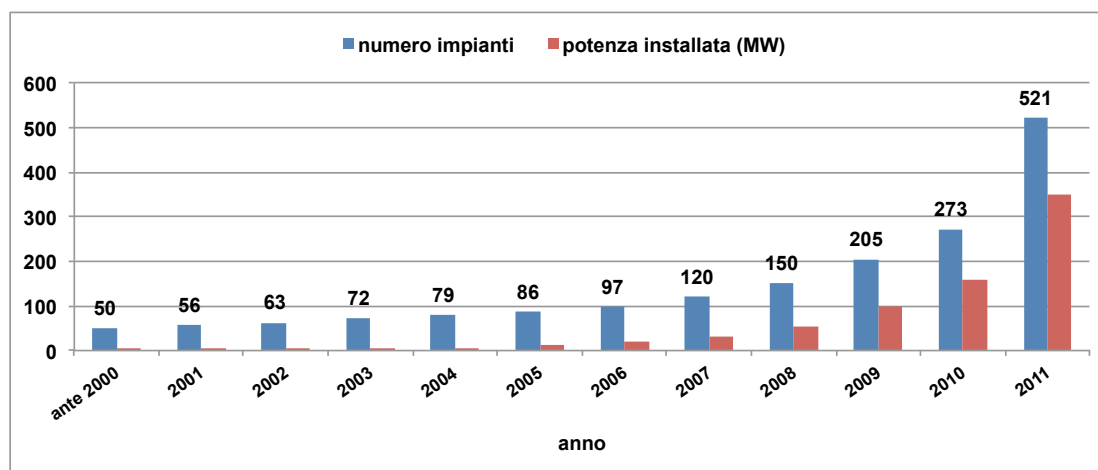


Fig 1.8 Trend del numero di impianti agro-zootecnici e relativa potenza installata in Italia negli ultimi 10 anni (fonte CRPA 2011)⁹

Dal punto di vista merceologico si definisce biogas la miscela gassosa combustibile ricavata dal processo di degradazione della sostanza organica da parte di un consorzio di microbico, in condizioni di totale assenza di ossigeno (comunemente definita digestione anaerobica)^{10,11}. In tale processo biochimico l'energia racchiusa nei legami chimici dei composti organici è rilasciata e immagazzinata nelle molecole di metano che, assieme

all'anidride carbonica, sono i principali costituenti del biogas (Tabella 1.1). Altre sostanze presenti in percentuale minore sono il monossido di carbonio, l'azoto molecolare e l'idrogeno solforato.

Caratteristica	Biogas
Potere calorifico inferiore (PCI) [MJ/Nm ³]	22,3
Contenuto in ossigeno	tracce
Contenuto in metano [% in peso]	52-58
Contenuto in anidride carbonica [% in peso]	40
Contenuto in idrogeno solforato (H ₂ S) [% in peso]	0,1
Stato	gassoso

Tab 1.1 Le caratteristiche chimiche, fisiche e merceologiche del biogas¹²

Il biogas prodotto per via fermentativa può essere utilizzato in diversi modi: come tale o dopo processi di purificazione per eliminare l'umidità e la presenza di idrogeno solforato che nei motori endotermici causa danni se presente a livelli superiori di 300-400 ppm.¹³

Diverse sono oggi le soluzioni tecnologiche adoperabili per sfruttare il biogas:

- produzione di calore e o vapore
- fonte energetica industriale per la produzione di calore, vapore, elettricità e raffreddamento
- purificazione ed utilizzo come biocombustibile per autotrazione ¹⁴
- produzione di intermedi chimici e proteine ¹⁵
- purificazione e immissione nella rete del gas naturale ¹⁶
- produzione di elettricità
- carburante per fuel cells

Il biogas è quindi un vettore energetico estremamente polifunzionale e utilizzabile per raggiungere gli importanti obiettivi imposti dal Comunità Europea, ovvero quelli riguardanti la produzione di energia elettrica da fonti rinnovabili e quelli relativi all'utilizzo di biocarburanti per autotrazione. In virtù del suo elevato potere calorifico inferiore (23 MJ/Nm³), il biogas oggi viene tradizionalmente utilizzato nei motori a ciclo Diesel e a ciclo Otto e convertito da questi in energia elettrica e in energia termica,

ottenibile da uno scambiatore di calore dal raffreddamento del motore e dei gas di scarico.

Tradizionalmente i materiali utilizzati sono oggi colture dedicate e reflui zootecnici, ma sono sfruttabili a fini energetici anche processi di codigestione, in cui si ricorre all'impiego contestuale di diverse tipologie di substrato, derivanti per esempio da biomasse residuali come residui industriali e sottoprodotti agro-industriali, frazioni separate di rifiuti solidi urbani, che possono rappresentare una fonte diffusa di substrati per biotrasformazioni anaerobiche in biogas. Molti sistemi agro-industriali infatti producono un'ampia varietà di materie prime come materiali ligno-cellulosici, residui colturali, oli vegetali e grassi animali come sottoprodotti.

Le fasi della digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo biologico, che consiste nella degradazione della sostanza organica in condizioni di assenza di ossigeno, con produzione di biogas quale prodotto principale. La produzione di biogas avviene ad opera di microrganismi che agiscono in fasi successive interconnesse tra di loro nello spazio e nel tempo: la degradazione dei substrati complessi (idrolisi) per azione dei batteri idrolitici, la fermentazione (acidogenesi e acetogenesi) a opera dei batteri acidificanti (acetogeni e omoacetogeni) e la produzione del metano (metanogenesi) per azione dei batteri metanigeni (figura 1.9).¹⁷

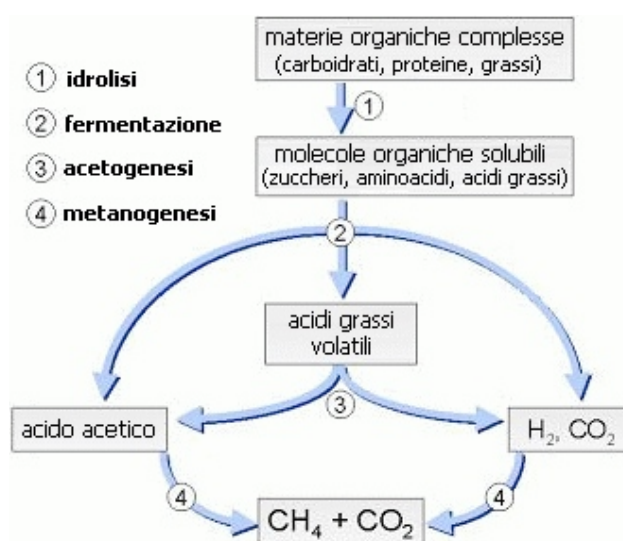


Fig 1.9 Rappresentazione schematica delle fasi della digestione anaerobica

La presenza di gruppi di microrganismi molto diversi porta a cercare un compromesso tra le diverse esigenze di crescita e sviluppo, per cui il controllo dei processi fermentativi risulta fondamentale per l'equilibrio della popolazione batterica esistente.

Fase di idrolisi

Nella prima fase della digestione anaerobica diversi gruppi batterici colonizzano il materiale in sospensione¹⁸ o idrolizzano, mediante enzimi esocellulari^{19,20}, substrati organici complessi come carboidrati, proteine e lipidi, con formazione di composti più semplici, quali aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi in forma solubile. Tutte le reazioni idrolitiche sono considerate come le fasi limitanti dell'intero processo di digestione anaerobica perché regolano la velocità complessiva del processo²¹, soprattutto nel caso di matrici lignocellulosiche in cui la degradazione e scomposizione molecolare è resa più difficile dalla struttura fisica del materiale. La presenza di lignina in tali strutture molecolari forma una barriera di accesso agli enzimi idrolitici coinvolti in questa fase prolungando l'intera fase del processo^{22,23,24}

Fase di acidogenesi

In questa fase i composti solubili che derivano dall'idrolisi vengono metabolizzate dai batteri acidogenici che operano l'ossidazione a piruvato dei substrati organici semplici come zuccheri e amminoacidi. Il piruvato viene successivamente trasformato in acidi grassi a catena corta di carbonio, come acido acetico, propionico e butirrico²⁵ oltre ad alcoli e chetoni che rappresentano i substrati di partenza per la successiva fase acetogenica. Le condizioni di pH e di pressione di H₂ nel substrato in fermentazione, possono determinare la formazione di diversi prodotti finali a partire da uno stesso substrato per attivazione di diverse vie metaboliche dei ceppi batterici acetogenici²⁶ (tabella 1.2). La degradazione del glucosio ad esempio può portare alla formazione di prodotti diversi in base alle diverse condizioni di H₂ presenti nel mezzo di coltura: una bassa pressione di H₂ favorisce per esempio la produzione di acetato ed idrogeno rispetto alla formazione di etanolo, acido acetico, butirrico e lattico.

Reazione chimica	Prodotto	Concentrazione H ₂
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	acido acetico	bassa H ₂
$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	acido acetico, propionico	qualunque H ₂
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$	acido lattico	qualunque H ₂
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H^+$	acido butirrico	basso H ₂

Tabella 1.2 Formazione di prodotti finali da glucosio a differenti condizioni di concentrazione di H₂²⁷

La degradazione degli acidi grassi a lunga catena da parte dei batteri acidogeni segue invece un metabolismo parallelo e può portare alla formazione di idrogeno e acido formico.²⁸

Fase di acetogenesi

In questa fase i batteri acetogeni metabolizzano le molecole non convertite in acido acetico derivanti dall'acidogenesi, come acido propionico, butirrico, lattico e alcoli, in acido acetico, H₂ e CO₂. Le reazioni chimiche coinvolte in questa fase sono rappresentate schematicamente nella tabella 1.3

Substrato	Reazione chimica
Acido propionico	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$
Acido butirrico	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Acido lattico	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$
Etanolo	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$

Tabella 1.3 Principali reazioni chimiche coinvolte nella fase acetogenica²⁹

La produzione di acido acetico avviene per opera di due classi di batteri acetogeni:

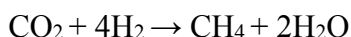
- *acetogeni obbligati di idrogeno*: ossidano gli acidi grassi volatili ad acido acetico con conseguente rilascio di idrogeno libero e CO₂.
- *omoacetogeni*: consumano idrogeno libero e CO₂ formando acido acetico.

La produzione di idrogeno da parte dei batteri acetogeni permette di instaurare delle relazioni sintrofiche con i batteri metanigeni che consumano invece idrogeno, permettendo così una continuità nell'intera catena trofica²⁸

Fase di Metanogenesi

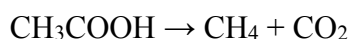
La produzione di metano rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica e avviene ad opera di un gruppo di microrganismi *archaea*, definiti come metanigeni, che vengono suddivisi in cinque ordini: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* e *Methanomicrobiales*³⁰

Le reazioni di metanogenesi possono avvenire attraverso due vie differenti dipendenti dal tipo di substrato utilizzato per la reazione³¹. Nella via idrogenotrofica si giunge alla formazione di metano grazie ai batteri idrogenotrofi a partire da CO₂ e H₂ secondo la reazione seguente:



La reazione coinvolta nel processo idrogenotrofico permette inoltre di regolare la concentrazione di ossigeno di tutto il processo.

La maggiore produzione di metano avviene però attraverso un meccanismo secondario, ovvero nella via acetoclastica, in cui l'acido acetico, risultante dalla fase di acetogenesi, viene degradato a metano e CO₂ secondo la reazione seguente, definita dismutazione dell'acido acetico:



La distribuzione dei flussi metabolici durante le diverse della catena metabolica che porta alla formazione di metano sono rappresentate schematicamente nella figura 1.10

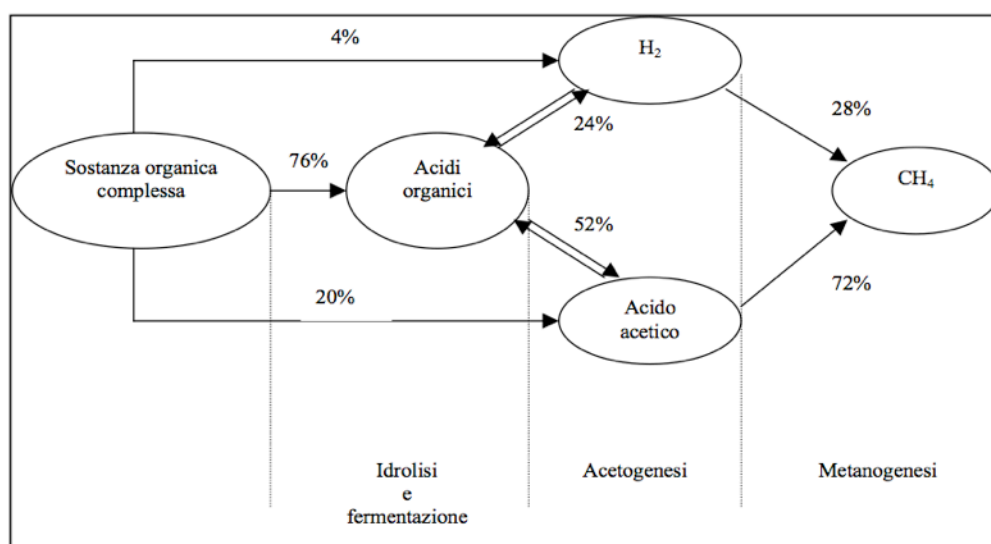


Fig 1.10 Rappresentazione schematica dei flussi metabolici nel processo di digestione anaerobica ³²

I batteri coinvolti responsabili della produzione di metano nella fase metanogenica sono i batteri maggiormente interessati dalle condizioni totali del processo fermentativo e per tale motivo sono necessarie particolari condizioni ambientali quali la presenza di microelementi importanti³³ per la loro crescita e potenziale redox inferiore a -300 mV, oltre a condizioni di pH compresi tra 7 e 8³⁴.

Produzione potenziale di biogas da diversi componenti delle biomasse

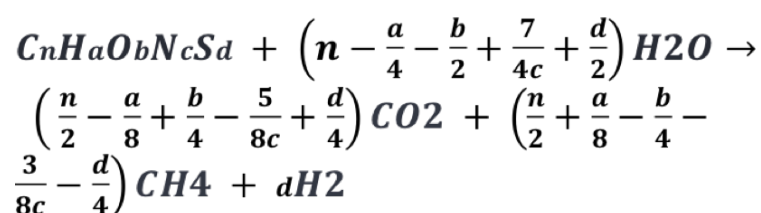
In un ambiente di fermentazione anaerobico ogni frazione organica ha una differente potenzialità produttiva, in termini di metano prodotto, e una differente degradabilità dovuta alla diversa capacità e velocità del consorzio microbico di metabolizzarle (tabella 1.4)

Componente organica	Degradabilità %	Biogas prodotto (litri)/ kg degradato	Resa in metano %
Carboidrati semplici	98	790	50
Carboidrati complessi	64	790	50

Componente organica	Degradabilità %	Biogas prodotto (litri)/ kg degradato	Resa in metano %
Proteine	57	700	71
Grassi	80	1250	67

Tabella 1.4 Produzione teorica di biogas prodotto da differenti componenti organiche³⁵

La produzione potenziale di biogas ottenibile da una biomassa è calcolabile attraverso una formula stechiometrica (n, a, b, c, d , rappresentano il numero di moli del relativo elemento chimico), nota già dal 1933³⁶ che presuppone però la conoscenza della composizione chimica elementare della biomasse stessa:



La formula di Symons e Buswell però non consente di stimare con precisione la produzione di biogas reale della biomassa a causa della complessità della struttura stessa della biomassa che limita la degradabilità delle varie frazioni organiche. In particolare nelle biomasse ligno-cellulosiche la struttura molecolare, conferita dalla presenza della lignina, ne abbassa la degradabilità anaerobica totale.

Composizione chimica e struttura delle biomasse ligno-cellulosiche

La produzione di biogas ottenibile da ogni tipo di matrice biologica dipende quindi strettamente dalla sua composizione chimica e dalle diverse frazioni organiche che la compongono. Nell'analisi della composizione organica delle matrici vegetali i carboidrati risultano i componenti quantitativamente più abbondanti e di maggiore interesse nei processi di trasformazione biochimica perché altamente degradabili, ma un rilievo importante ha anche la presenza di lignina che complessa parte di tali carboidrati rendendoli indisponibili nei processi fermentativi.

Carboidrati

I carboidrati sono i composti che le piante verdi sintetizzano nelle foglie attraverso il processo di fotosintesi clorofilliana e l'utilizzo di energia solare, e hanno un ruolo importante dal punto di vista biologico perché costituiscono energia di riserva e un ruolo strutturale.

I carboidrati principali che costituiscono la matrice vegetale sono rappresentati dai polisaccaridi:

- amido
- cellulosa
- emicellulosa
- pectine

L'amido è un polimero di glucosio che costituisce un materiale di riserva dei vegetali, che lo utilizzano come fonte di glucosio ed è costituito da due frazioni polisaccaridiche: l'amilosio e l'amilopectina. L'amilosio è un polimero lineare di unità D-glucosidiche, variabili da meno di cento a più di mille, legate tra la posizione C-1 di un'unità e l'ossidrilica in posizione C-4 di quella successiva (figura 1.11); l'amilopectina invece è un polisaccaride ramificato, in cui catene analoghe a quelle dell'amilosio si uniscono con legami di tipo α tra la posizione 1 di una catena e la posizione 6 di un'altra catena (figura 1.12).

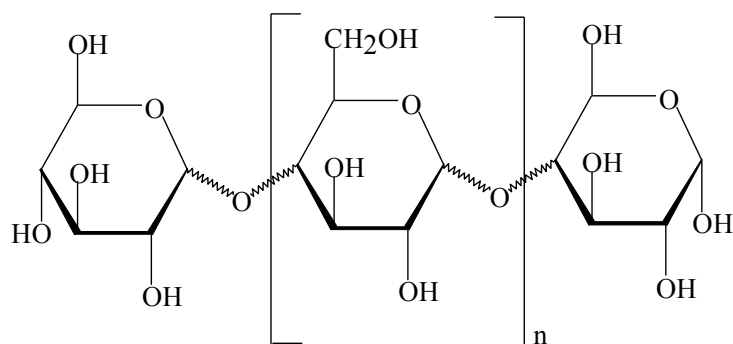


Fig 1.11 Struttura lineare di unità D-glucosidiche: amilosio

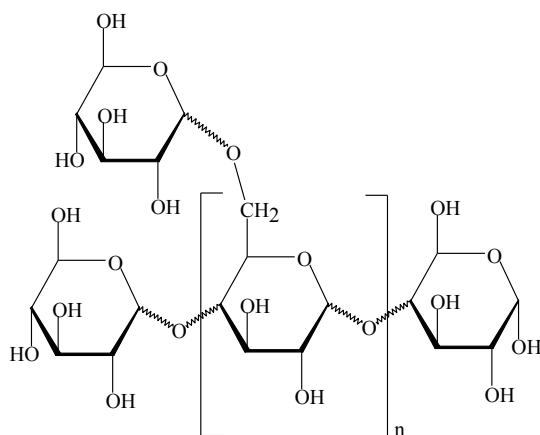


Fig 1.12 *Struttura ramificata di unità D-glucosidiche: amilopectina*

La cellulosa è un polisaccaride molto abbondante in natura, essendo il componente principale del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali. Strutturalmente è un polimero di unità di D-glucosio unite con legami di tipo β -1,4³⁷ in cui le catene polimeriche sono disposte fianco a fianco mediante un numero elevatissimo di legami idrogeno formando dei filamenti a forma sinusoidale (figura 1.13)

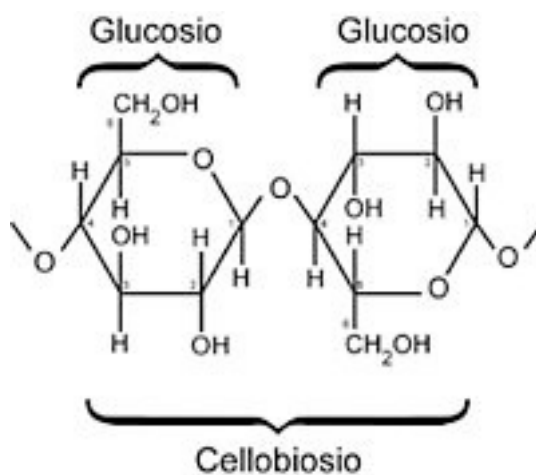


Fig 1.13 *Struttura del cellobiosio: unità costituente della cellulosa*

Le emicellulose sono polisaccaridi ramificati di varia struttura costituiti da esosi (glucosio, mannosio, galattosio) e pentosi (xilosio e arabinosio) policondensati in modo analogo al glucosio della cellulosa, ovvero mediante legami β -1,4.

L'emicellulosa maggiormente presente nelle pareti cellulari vegetali è lo xiloglucano; altre emicellulose sono il glucuronoxilano, l'arabinoxilano, il glucomannano e il galattomannano.

La composizione chimica delle emicellulose varia con la crescita e la maturazione della pianta e dipende dalle condizioni ambientali. Le emicellulose includono anche le pectine, costituite da ramnosio e catene di residui di acido D-galatturonico, che polimerizza mediante legami α -1,4; questa catena è intervallata da residui di 1,2-L-ramnosio.

Tra le pectine rientrano complessi polisaccaridi ad elevato peso molecolare (tra i 20 e i 400 KDa) e di natura acida, che contribuiscono largamente alla formazione dei tessuti specialmente dei frutti e delle parti vegetali eduli. Nella struttura delle pectine sono presenti anche altri carboidrati come D-galattosio, L-arabinosio, D-xilosio e L-fucosio che formano ramificazioni nella molecola.

Fino ad oggi sono state caratterizzate tre classi di polisaccaridi pectici:

- omogalatturonano (HG);
- ramnogalatturonano (RGI);
- galatturonani sostituiti (SG).

L'omogalatturonano (figura 1.14) è una catena lineare la cui unità monometrica è acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α -1,4, nella quale alcuni gruppi carbossilici sono esterificati con metanolo. L'omogalatturonano costituisce il 60% dei polisaccaridi pectici nella parete cellulare.

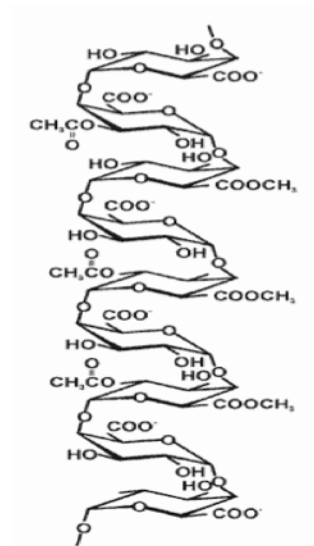


Figura 1.14 Struttura dell'omogalatturonano

Il ramnogalatturonano (figura 1.15) è un polisaccaride la cui unità monometrica è il disaccaride 4- α -D-Galp-(1,2)- α -L-Rhap1, dove “Gal” sta per acido D-galatturonico e “Rha” per L-ramnosio. Sono poi presenti vari gruppi laterali, principalmente arabinani e galattani.

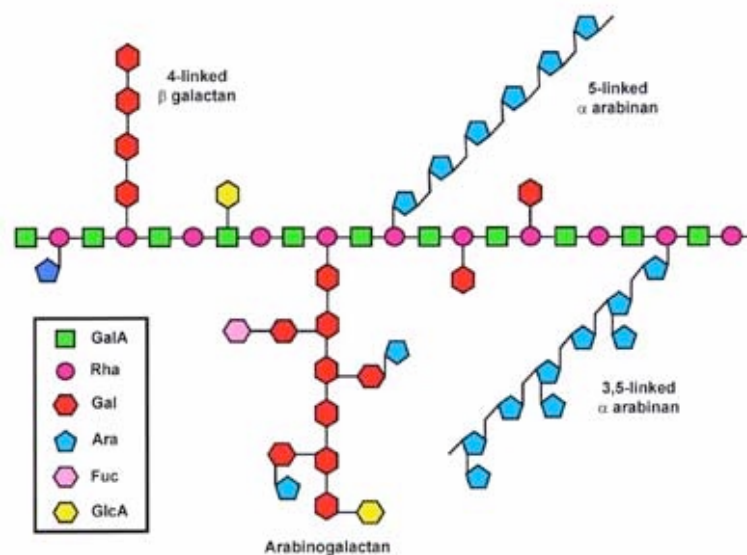


Fig 1.15 La rappresentazione del ramnogalatturonano (RGI)

Le sostanze pectiche ed emicellulosiche sono prodotte nell'apparato di Golgi ed in seguito inglobate in vescicole attraverso le quali migrano attraverso la plasma

membrana dove sono rilasciate e integrate in una membrana pre-esistente; la cellulosa viene invece sintetizzata direttamente nella plasma membrana.

Lignina

La lignina è il polimero più abbondante in natura dopo la cellulosa³⁸ ed è costituito da diversi monomeri fenolici strettamente condensati che la rendono piuttosto complesso dal punto di vista molecolare.

I monomeri principali costituenti la lignina sono 3 (figura 1.16):

- alcol p-cumarilico
- alcol coniferilico (alcol 4-idrossi-3-metossicinnamilico)
- alcol sinapilico (alcol 4-idrossi-3,5-dimetossicinnamilico)

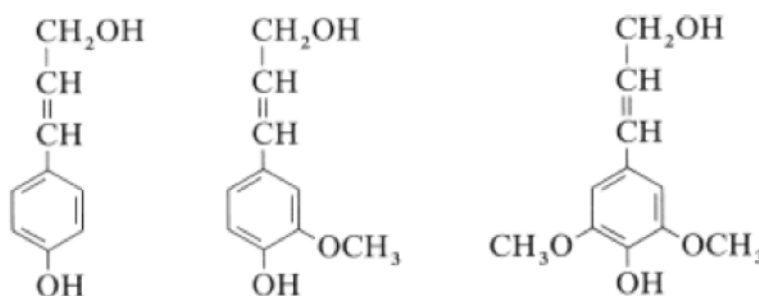


Fig 1.16 *Monomeri principali costituenti della lignina: alcol cumarilico, coniferilico e sinapilico*

La sintesi di questi prodotti fenolici dipende da prodotti intermedi del metabolismo dei carboidrati, quindi risulta indirettamente collegata ai polisaccaridi della parete cellulare. Mentre la lignina non può essere propriamente chiamata un carboidrato, si trova nella cellula vegetale in stretta associazione con i polisaccaridi. Principalmente la lignina è associata alla cellulosa ed ad altri polisaccaridi delle pareti cellulari secondarie del tessuto xilematico, dove può raggiungere il 25% del peso secco del legno delle piante legnose (Tabella 1.5).

Matrice ligno cellulosica	Cellulosa (%)	Emicellulosa	Lignina (%)
fusto legnoso duro	40-55	24-40	18-25
fusto legnoso tenero	45-50	25-35	25-35
guscio di noce	25-30	25-30	30-40
carta	85-99	0	0-15
paglia di frumento	30	50	15
fogliame	15-20	80-85	0
semi di cotone	80-95	5-20	0
<i>panico verga</i> (<i>Panicum</i> <i>virgatum</i>)	45	31	12

Tab 1.5 Composizione lignocellulosica di alcune matrici sul peso secco³⁹

La lignina compone strutturalmente la parete cellulare secondaria delle cellule vegetali la quale si sviluppa sopra la parete cellulare primaria dopo che la cellula si è completamente distesa. La parete cellulare secondaria, interna alla parete primaria, è composta da tre strati: S1, S2 ed S3⁴⁰ come rappresentato schematicamente in figura 1.17

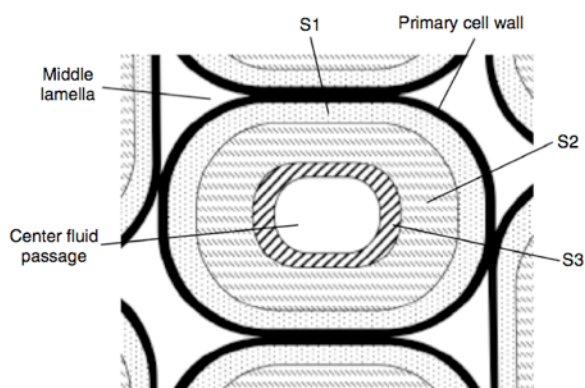


Fig 1.17 Rappresentazione schematica della parete cellulare secondaria

Lo strato più spesso, S2, è composto da microfibrille composte da lunghe molecole di cellulosa circondato da strutture amorphe di cellulosa ed emicellulose (legate alle microfibrille mediante legami idrogeno), a loro volta avvolte da polimeri di lignina. Lo strato S2 è quello in cui cellulosa ed emicellulosa sono maggiormente presenti. La distribuzione di cellulosa, emicellulosa e lignina è rappresentata schematicamente in figura 1.18

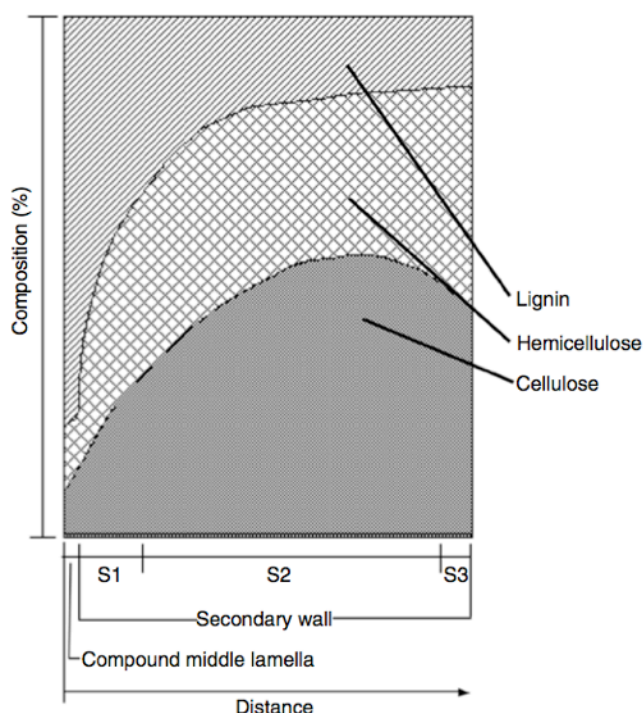


Fig 1.18 Distribuzione di cellulosa, emicellulosa e lignina negli strati della parete cellulare secondaria

L'insolubilità in acqua⁴¹, le forti interazioni interne al nucleo cristallino di cellulosa⁴² e la complessità della struttura tridimensionale dovuta al rivestimento da parte delle strutture amorphe di cellulosa ed emicellulose⁴³ ostacolano l'accesso degli enzimi idrolitici alle catene di cellulosa⁴⁴ ed emicellulosa, rendendo la loro idrolisi uno step limitante per la velocità dell'intero processo di digestione anaerobica. Biomasse ricche di interazioni tra lignina e cellulosa sono ad esempio sottoprodotti vegetali come la paglia e i grapi d'uva che risultano quindi scarsamente produttivi in termini di biogas. Ciò rende necessario l'impiego di metodi di pre-trattamento per aumentare la produttività in metano e quindi l'efficienza del processo.

Pre-trattamenti dei substrati ligno-cellulosici

L'evoluzione del settore relativo ai biocarburanti, soprattutto di seconda generazione, ha spinto la ricerca a trovare e investigare metodiche in grado di aumentare la degradabilità biochimica di substrati ligno-cellulosici, non solo per la produzione di bioetanolo, settore oggi molto interessato da tecniche di pre-trattamento delle biomasse, ma anche per la produzione di biogas e bioidrogeno.

L'utilizzazione a scopo energetico di biomasse ligno-cellulosiche richiede la separazione dei componenti polimerici principali che compongono la parete cellulare vegetale (emicellulosa, cellulosa e lignina), per cui devono essere utilizzati pre-trattamenti mirati che alterino la struttura fisica delle cellule vegetali per rendere più accessibili i carboidrati complessi ad enzimi che convertono tali polimeri in zuccheri semplici^{45,46,47}(figura 1.19)

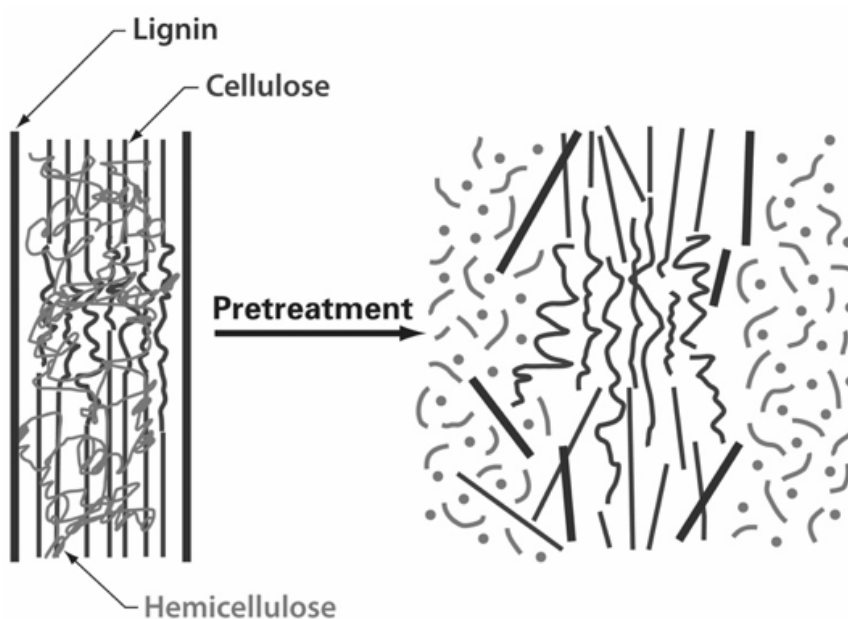


Fig 1.19 Rappresentazione schematica dell'effetto del pretrattamento sulla struttura lignocellulosica

I meccanismi utilizzati per rendere la cellulosa più accessibile agli enzimi dipendono dalla tipologia di pre-trattamento e dalla natura del materiale trattato. Ogni pre-trattamento determina la configurazione di tutto il processo produttivo, in particolare dei successivi step fermentativi, e deve bilanciare poi i costi di down-stream del processo, oltre ai costi operativi, capitali e delle biomasse utilizzate.^{48,49} La richiesta di una bassa

quantità di energia totale è per esempio descritta come un fattore chiave per la sostenibilità economica di tutto il processo.^{50,51}

Le proprietà necessarie per rendere efficiente un pre-trattamento possono essere così riassunte:

- alta efficienza per differenti biomasse e diverse epoche di raccolta
- frazione solida altamente fermentabile
- nessuna degradazione degli zuccheri
- bassa quantità di composti tossici generati
- bassa produzione di rifiuti solidi di scarto
- compatibilità del pre-trattamento con il processo di fermentazione
- recupero della lignina
- bassa richiesta di calore ed energia

L'efficacia complessiva del pre-trattamento può essere attribuita alla rottura dei legami tra lignina e carboidrati⁵², e all'incremento della porosità del materiale trattato.⁵³

Negli ultimi anni sono state investigate molte tecnologie di pretrattamento e queste vengono comunemente classificate in:

- meccanico-fisici
- termici
- chimici
- biologici

Pretrattamenti meccanico-fisici

L'obiettivo del trattamento meccanico è la riduzione delle dimensioni della biomassa e del suo grado di cristallizzazione, al fine di incrementare la superficie disponibile all'idrolisi enzimatica. Maggiore è l'efficacia del trattamento, maggiore è l'effetto positivo sull'incremento dell'idrolisi stessa.

Questo effetto può essere ottenuto attraverso il taglio, la macinazione o triturazione del materiale o attraverso una combinazione di questi. Le dimensioni delle particelle ottenute dipendono generalmente dal tipo di trattamento adoperato (10-30 mm con il taglio, 0,2-2 mm con macinazione o triturazione)⁵⁴.

L'energia richiesta da questo tipo di pretrattamento dipende dalla dimensione finale e dalle caratteristiche della biomassa, oltre che dalle caratteristiche stesse della macchina

utilizzata: tipologia, dimensione degli elementi macinanti, velocità di rotazione e distanza degli elementi macinanti.

Estrusione

Alle tecniche di macinazione e triturazione adottate per diminuire la dimensione delle particelle di biomassa, si affianca oggi l'utilizzo dell'estrusione quale pretrattamento fisico per la destrutturazione delle biomasse. Nell'estrusione le biomasse trattate sono soggette al riscaldamento, mescolamento e triturazione attraverso il passaggio nell'estrusore, costituito da una vite senza fine singola o doppia (coclee) che ruota all'interno di un cilindro di acciaio in cui è presente la biomassa che viene spinta verso un'uscita. Tale soluzione tecnologica ha quindi il vantaggio di procurare un efficace rottura e mescolamento del materiale trattato, oltre che un rapido trasferimento del calore.⁵⁵ La velocità delle coclee e la temperatura raggiunta permettono la rottura della struttura ligno-cellulosica per disgregazione delle fibrille della parete cellulare vegetale e dell'accorciamento della struttura delle fibre, aumentando così l'accessibilità degli enzimi ai carboidrati fermentabili.⁵⁶ Nell'utilizzo di questa applicazione tecnologica risiedono alcuni svantaggi economici, in quanto sono richieste elevate quantità di energia per il funzionamento dell'estrusore, oltre ai costi rilevanti di manutenzione per la sostituzione delle coclee soggette a forte usura e al costo di acquisto del dispositivo.

Ultrasuoni

Gli ultrasuoni, definiti onde meccaniche sonore con frequenze non udibili dall'orecchio umano, sono state impiegate in numerosi processi biologici e chimici e in particolare nelle biomasse lignocellulosiche per l'estrazione di emicellulose, cellulose e lignina.⁵⁷ Il trattamento con gli ultrasuoni provoca la formazione di bolle di cavitazione nella fase liquida, portando queste bolle fino al collasso e all'esplosione quando raggiungono la dimensione critica. L'impatto meccanico causato dal collasso delle cavitazioni procura un importante beneficio nell'apertura della superficie solida del substrato e quindi per l'azione degli enzimi. E' possibile raggiungere l'effetto di cavitazione anche a temperature di 50°C, che rappresentano l'optimum per molti enzimi idrolitici⁵⁸

Pre-trattamenti termici

I pre-trattamenti di tipo termico prevedono l'utilizzo di acqua ad alta pressione che mantiene elevata la sua temperatura (120-240°C), provocando una alterazione della struttura lignocellulosica a causa della solubilizzazione delle emicellulose^{59,60,61}, che in parte idrolizzandosi forma acidi che catalizzano la sua stessa idrolisi⁶². Il trattamento

termico rende le cellulose maggiormente accessibili, sebbene queste, insieme alla lignina, non sono significativamente attaccate e rimangono nella fase solida. Con questo tipo di trattamento la lignina è solo parzialmente depolimerizzata e solubilizzata ed una completa destrutturazione della stessa appare improbabile soltanto con l'utilizzo di acqua ad elevata temperatura, per effetto della ricondensazione dei componenti solubili originati dalla lignina⁶³. La parziale solubilizzazione della lignina, a temperature superiori ai 160°C, provoca inoltre la solubilizzazione di composti fenolici che in molti casi hanno un effetto inibitorio per lieviti e batteri, soprattutto *archaea* metanigeni coinvolti nella formazione del metano⁶⁴. Condizioni particolarmente estreme di temperatura promuovono inoltre la condensazione e precipitazione di componenti solubili della lignina, altrettanto tossici per il metabolismo microbiologico, come furfurolo e idrossimetilfurfurolo (HMF)^{65,66}

In generale tali pretrattamenti di tipo termico appaiono interessanti per il costo relativamente basso in quanto non sono richiesti catalizzatori o reattori con costi elevati. La possibilità di scegliere dei set-point di temperatura permette inoltre di ridurre la presenza di prodotti inibitori per i processi fermentativi.

Pre-trattamenti chimici

Trattamento con acidi

Il pre-trattamento con acidi prevede l'impiego di acidi forti o diluiti che in entrambi i casi hanno effetto nella solubilizzazione dell'emicellulosa e della cellulosa. L'utilizzazione di acidi forti appare poco interessante a causa della formazione di prodotti secondari inibitori delle fermentazioni come furfurolo e altri prodotti volatili. Inoltre comportano fenomeni di corrosione e il recupero di tali acidi risulta molto svantaggioso nell'intera gestione del processo. L'utilizzo di acidi diluiti limita tali effetti negativi del trattamento nelle applicazioni di tipo industriale e inoltre può essere svolto a temperature elevate (es. 180°C), e per tempi più lunghi (30-90 minuti). Per tale tipologia di trattamento si ottengono idrolisi efficaci mediante l'utilizzo di H₂SO₄, che è l'acido maggiormente utilizzato, o HCl, H₃PO₄ e HNO₃.⁶⁷

Trattamento con basi

Il trattamento con basi provoca reazioni di saponificazione e solvatazione che causano un rigonfiamento delle pareti cellulari vegetali che aumenta la degradabilità della cellulosa e dell'emicellulosa, seppure con effetti minori rispetto al trattamento con acidi.

Nei pretrattamenti di tipo basico sono generalmente impiegati basi quali NaOH, KOH, Ca(OH)_2 e NH_4OH , a basse o elevate temperature. Un'aspetto importante da considerare con l'utilizzo di basi su biomasse con alto contenuto in lignina è la formazione di prodotti secondari inibitori di processi fermentativi coinvolti nella digestione anaerobica ⁶⁹. L'utilizzo di basi può inoltre causare la solubilizzazione e la condensazione della lignina con conseguente modificazione della struttura cristallina della cellulosa, provocando un'azione contraria a quella desiderata dal trattamento⁷⁰

Pre-trattamenti biologici

L'utilizzo di pre-trattamenti meccanici, termici e chimici comportano in molti casi un'alta richiesta energetica, una parziale degradazione degli zuccheri e la possibile formazione di prodotti secondari che sono inibenti per i batteri coinvolti nei processi fermentativi che portano alla degradazione della sostanza organica. Diversamente da questo tipo di soluzioni tecnologiche, i pre-trattamenti di tipo biologico, che prevedono l'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici o di funghi, hanno diversi vantaggi che risiedono nella riduzione dell'input energetico necessario per il pre-trattamento, la mancata richiesta di prodotti chimici e di impianti resistenti alla corrosione di tali prodotti, inoltre non danno origine alla formazione di prodotti inibitori per i processi fermentativi ^{71,72}.

Pre-trattamenti enzimatici

La biotecnologia moderna è stata travolta negli ultimi anni dall'impatto con l'ingegneria genetica, che ha permesso di produrre da molti substrati notevoli quantità di enzimi in grado di soddisfare i fabbisogni necessari alle esigenze industriali. L'inferiore costo di produzione ha permesso l'ingresso di tali catalizzatori in molti campi della produzione industriale mondiale, consentendo di ottenere diversi vantaggi in molti sistemi produttivi.

Cellulasi

Le cellulasi (EC:3.2.1.4.) sono una classe di enzimi in grado di degradare i legami di tipo β 1-4 glicosidici delle subunità di glucosio che costituiscono il polimero cellulosa (figura 1.20).

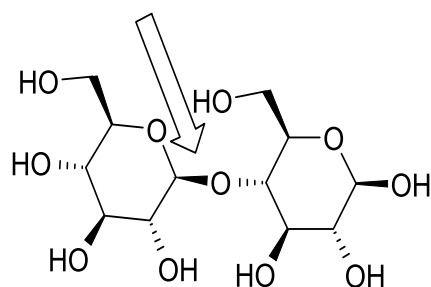


Fig 1.20 Legame β glicosidico tra unità di glucosio

Si distinguono diverse classi di cellulasi che idrolizzano selettivamente parti diverse del polimero:

- *Esocellulasi*: idrolizzano le terminazioni della catena polisaccaridica liberando sequenzialmente oligomeri di glucosio a basso peso molecolare (cellobiosio);
- *Endocellulasi*: idrolizzano i legami interni della catena polisaccaridica riducendo così il peso molecolare medio delle catene;
- *β -glucosidasi*: catalizzano l'idrolisi delle unità di glucosio costituenti il cellobiosio, formando monomeri di glucosio.

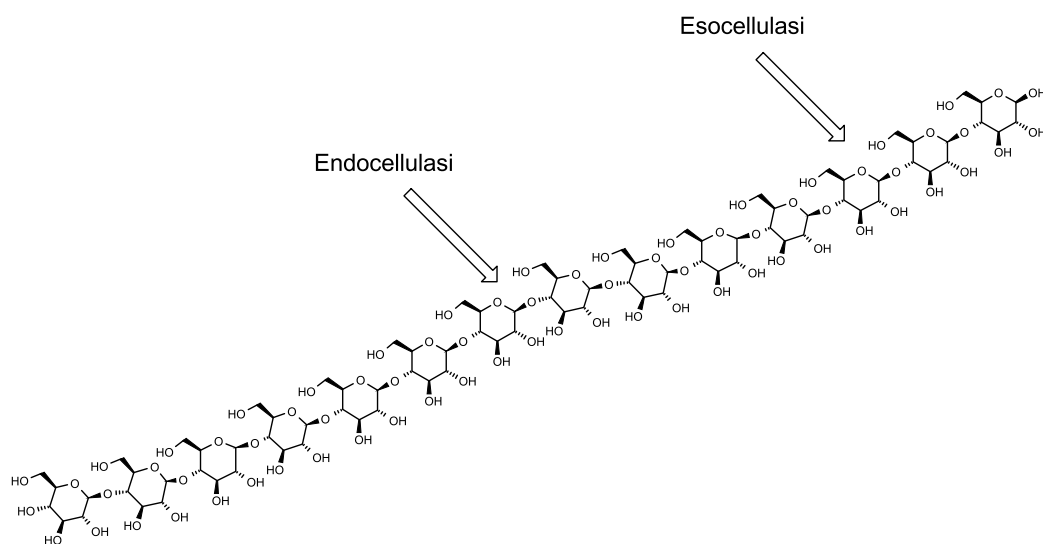


Fig 1.20 Azione idrolitica degli enzimi eso- ed endocellulasi sulla struttura polimerica della cellulosa

L'azione delle endo- ed esocellulasi risulta quindi importante nella destrutturazione dell'intero polimero di cellulosa, mentre le β glucosidasi sono necessarie per ottenere un incremento di glucosio disponibile. L'azione delle β -glucosidasi peraltro è estremamente importante ai fini industriali in quanto le cellulasi, come tutte le carboidrasi, soffrono di inibizione competitiva da prodotto, soprattutto a causa di oligomeri a basso peso molecolare. La presenza di β -glucosidasi che rimuovono il cellobiosio idrolizzandolo, consente di migliorare le preformance idrolitiche dei trattamenti a base di cellulasi.

Amilasi

Le amilasi sono una classe di enzimi presenti nei microrganismi, nelle piante e negli animali che idrolizzano i legami α -glicosidici nell'amido (figura 1.21).

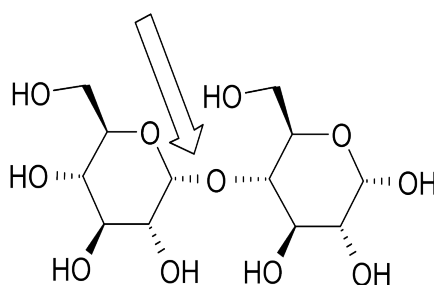


Fig 1.21 legami α glicosidico tra unità di glucosio

I diversi legami sono idrolizzati da classi enzimatiche diverse che vengono classificate sulla base del loro meccanismo d'azione:

- *Endamilasi*: sono piccole proteine enzimatiche di basso peso molecolare (20-25 kDa), dette anche α -amilasi, che catalizzano l'endoidrolisi dei legami 1,4- α -D-glicosidici di oligosaccaridi e polisaccaridi contenenti tre o più residui. L'enzima agisce in maniera casuale su amido, glicogeno e molecole ad esse correlate. Il termine α non si riferisce al tipo di legame glicosidico che viene idrolizzato, ma alla configurazione degli zuccheri prodotti che, infatti, presentano una configurazione α sul C1 di ciascuna unità glicosidica;
- *Esoamilasi*: dette anche β -amilasi le quali idrolizzano i legami glicosidici α 1,4 nell'amilosio, nell'amilopectina e nel glicogeno, partendo dalla fine della catena e

formando così una successione di unità di maltosio o glucosio. Questi prodotti dell'idrolisi presentano una configurazione β sul C1 di ciascuna unità glicosidica, da qui il nome di β -amilasi. A differenza delle endoamilasi, le esoamilasi diminuiscono lentamente la viscosità della soluzione di amido;

- *Gamma-amilasi*

Sia le α -amilasi sia le β -amilasi non sono in grado di idrolizzare legami α -1,6.

Xilanasi

Le xilanasi sono enzimi che idrolizzano i legami glucidici tra residui di xilano (figura 1.22). La completa degradazione dello xilano richiede l'azione di xilanasi, endo β -1,4 xilanasi e β -1,4 xilosidasi. La catena principale del polimero polisaccaridico è composta da residui di xilosio uniti da legami glicosidici β -1,4 con catene laterali di varia natura.

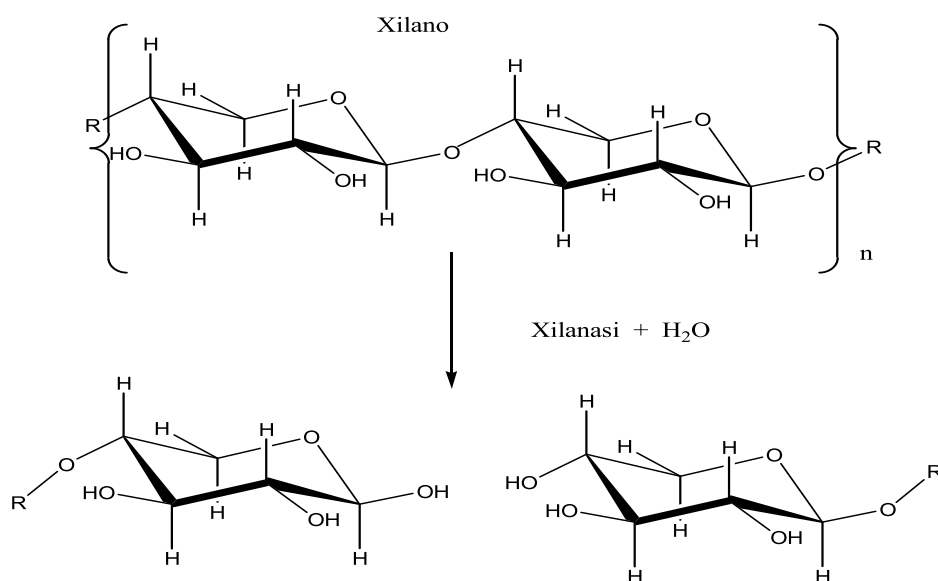


Fig 1.22 Reazione idrolitica dello xilano catalizzata da xilanasi

Lo xilano è il polisaccaride non cellulosico più abbondante, presente nella parete secondaria delle cellule vegetali il quale forma una sorta di interfase tra la lignina e gli altri polisaccaridi. Le molecole di xilano sono legate covalentemente alla lignina attraverso residui fenolici, e interagiscono con gli altri polisaccaridi come la pectina e il glucano.

Pectinasi

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di idrolizzare le strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale.

Le pectinasi sono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano nella struttura pectica (figura 1.23):

- - *polimetilgalatturonasi* e le *poligalatturonasi* (EC 3.2.1.15): idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico;
- - *pectinesterasi* (EC 3.1.1.11) rimuovono il gruppo metile delle pectine idrolizzando il legame estere, ove presente, del carbossile del galatturone;
- - *pectin liasi* (EC 4.2.2.10) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico tramite un meccanismo di trans-eliminazione inusuale per le carboidrasi che produce dei galatturonati o metilgalatturonati insaturi.

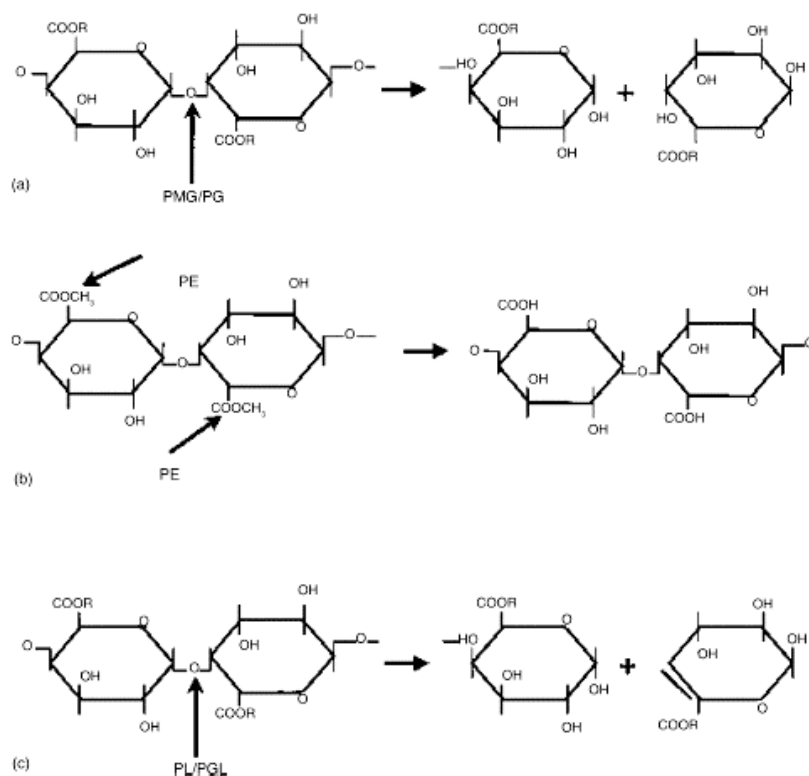


Fig 1.23 Modo d'azione delle pectinasi: (a) $R = H$ per PG e CH_3 per PMG; (b) PE; e (c) $R=H$ per PGL e CH_3 per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasi (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasi (EC-4.2.2.10) (Da Jayani et al. 2005) ⁷³.

Laccasi

Le laccasi (benzenediolo:ossigeno ossidoreduttasi; EC 1.10.3.2) sono enzimi ampiamente distribuiti in natura e appartengono alla famiglia delle ossidasi blu contenenti rame che comprende anche l'ascorbato ossidasi delle piante e la ceruloplasmina dei mammiferi⁷⁴. Varie forme di tali enzimi si trovano in piante superiori⁷⁵, batteri⁷⁶, ed insetti, ma le produzioni più abbondanti di tali enzimi avvengono nei funghi, in particolare i basidiomiceti white-rot, i quali producono diverse isoforme di queste proteine⁷⁷.

Il ruolo fisiologico della laccasi non è completamente chiarito anche perché esso sembra variare in relazione al tipo di organismo da cui deriva l'enzima. Per molti anni si è ritenuto che la laccasi prodotta da numerose specie fungine avesse un ruolo diretto nell'ossidazione della lignina. Infatti molti basidiomiceti, soprattutto i funghi "white-

rot”, sono in grado di mineralizzare la lignina completamente, o comunque in misura molto elevata rispetto ad attinomiceti e batteri. La degradazione della lignina è strettamente correlata alla capacità di questi microrganismi di produrre laccasi esocellulari in associazione con altre enzimi ossidativi quali lignina perossidasi (LiP) e manganese perossidasi (MnP).

Le laccasi sono *p-difenolossidasi* che catalizzano l’ossidazione di numerosi composti aromatici, in particolare fenoli, con la concomitante riduzione di ossigeno molecolare ad acqua, mediante il trasferimento di quattro elettroni. Nella laccasi la riduzione dell’ossigeno ad acqua è conseguente alla ossidazione di un substrato fenolico dal quale si genera un radicale catione instabile (figura 1.24).

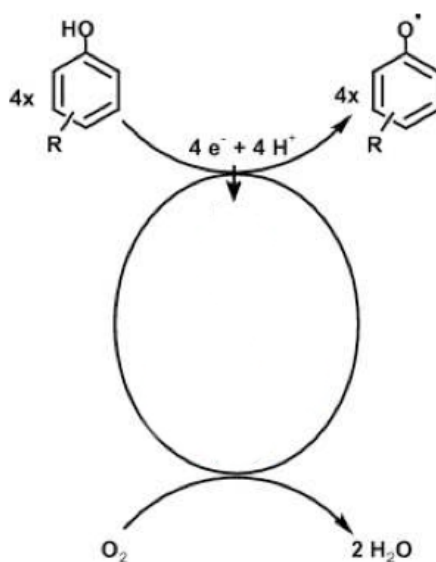


Fig 1.24 Ciclo catalitico delle laccasi

La catalisi enzimatica della laccasi comporta l’ossidazione dei composti fenolici, tramite la sottrazione di un elettrone e la formazione di un fenossiradicale o di un radicale cationico, che può seguire vari destini:

- promuovere reazioni di depolimerizzazione^{78,79}
- subire reazioni non enzimatiche, come idratazioni o ripolimerizzazioni⁷⁹ dovute ad un accoppiamento ossidativo con formazione di oligomeri e polimeri. Probabilmente questa funzione è utile, a livello fisiologico, per allontanare composti altamente reattivi

e tossici per il micelio fungino, che si formano durante il processo ligninolitico⁸⁰ (figura 1.25)

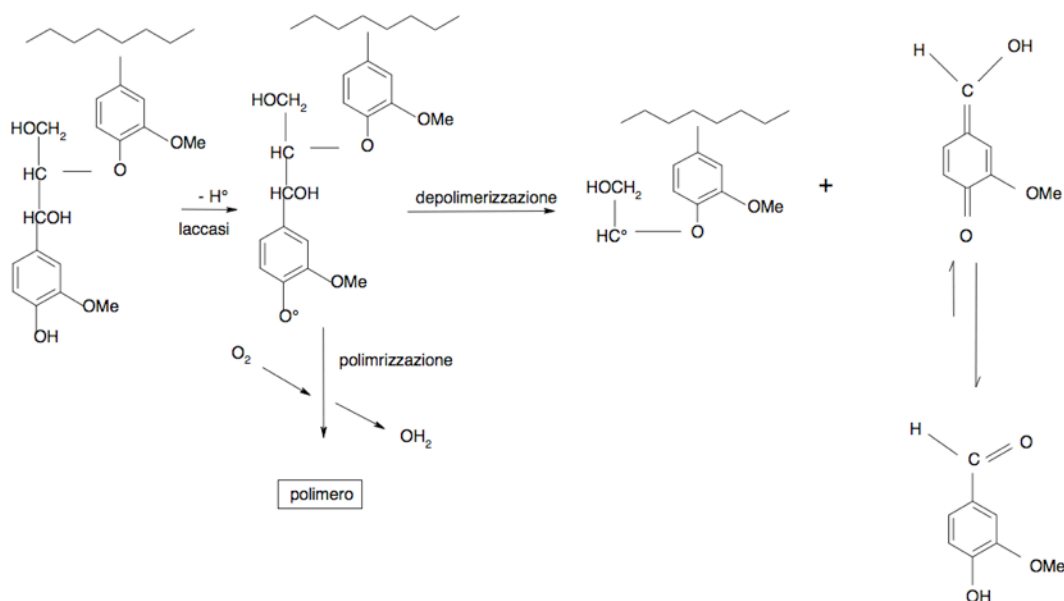


Fig 1.25 Meccanismo di ossidazione radicalica catalizzata dalla laccasi: depolimerizzazione o polimerizzazione

L'utilizzo di tali enzimi per il pre-trattamento di biomasse ligno-cellulosiche può portare alla rottura di alcuni legami presenti nella lignina, tramite reazioni di ossidazione, di demetilazione e dell'eliminazione della catena laterale della lignina, passaggio iniziale per la biodegradazione, consentendo una maggiore accessibilità di enzimi idrolitici alla degradazione di cellulose ed emicellulose. La maggior parte, ma non tutte le laccasi fungine sono extracellulari, alcune specie possono produrre isoenzimi sia extracellulari che intracellulari. Una di queste laccasi prodotta da *Pleutotus ostreatus* mostra attività sia all'interno della cellula che nella parete cellulare⁸¹.

Perossidasi

Le perossidasi (E.C. 1.11.1.7) sono ossidoreduttasi che catalizzano reazioni di ossidazione di substrati organici o inorganici sfruttando come donatore di elettroni il perossido di idrogeno. Il gruppo delle perossidasi viene suddiviso in due superfamiglie che distinguono gli enzimi di origine animale da quelli di origine fungina, batterica e vegetale. Gli organismi maggiormente studiati sono i cosiddetti funghi della putrefazione bianca (*white-rot fungi*); in questo gruppo sono comprese specie come *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida* e *Trametes hirsutus*.

Questi funghi hanno dimostrato eccezionale abilità nel degradare completamente la lignina a biossido di carbonio mediante un meccanismo d'azione di tipo radicalico che coinvolge un complesso sistema multienzimatico costituito dalle perossidasi e dagli enzimi produttori di H_2O_2 e che comprende alcol veratrilico (alcol 3,4-dimetossibenzilico), manganese e ossalato⁸². Gli enzimi che catalizzano la reazione di degradazione della lignina in *P. chrysosporium* sono la lignina perossidasi (LiP) e la manganese perossidasi (MnP), entrambe determinano l'ossidazione di mediatori radicalici, i quali, a loro volta, causano l'inizio della reazione di degradazione.

Fermentazioni Fungine

Pre-trattamenti biologici possono essere attuati mediante l'utilizzo di *brown e white rot fungi* che degradano la lignina e la cellulosa⁸³, soprattutto *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, and *Pleurotus ostreatus* hanno dimostrato su substrati lignocellulosici un'alta efficienza di destrutturazione del complesso lignina-cellulosa^{84,85}. I funghi *white-rot*, appartenenti generalmente al gruppo dei Basidiomiceti, colonizzano in natura il legno e preferenzialmente decompongono lignina in materiali lignocellulosici causandone il marciume bianco, la cosiddetta carie bianca del legno. Il nome *white rot* deriva appunto dall'aspetto del legno attaccato da questi funghi, nel quale l'eliminazione della lignina porta ad uno scolorimento del substrato. L'ossidazione della lignina da parte delle ife fungine non produce un guadagno netto di energia, perchè la lignina non è un substrato direttamente utilizzato nel metabolismo primario dei funghi ma viene degradata durante il metabolismo secondario allo scopo di aver accesso ai polisaccaridi strutturali del complesso ligno-cellulosico, fornendo così una fonte di energia alla quale altri organismi non hanno accesso⁸⁶. I funghi hanno sviluppato evolutivamente un sistema degradativo aspecifico localizzato nell'ambiente extracellulare basato sulla produzione e l'escrezione di un gruppo di enzimi, che sono normalmente sintetizzati in risposta ad una riduzione o ad una limitazione delle fonti azotate e/o carboniose⁸⁷.

In particolare, i funghi *white-rot*, in base al tipo di substrato colonizzato e al tipo di enzimi ossidativi rilasciati, vengono classificati in cinque gruppi principali:

- I. *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlaeobius radiatus*⁸⁸, producono la lignina perossidasi, la manganese perossidasi e la laccasi;
- II. *Dichomitus squalens*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*^{89,90}, producono sia la manganese perossidasi che la laccasi e sono forti degradatori di lignina.
- III. Si inseriscono quei funghi che rilasciano la lignina perossidasi in genere associata con uno degli altri due enzimi già citati, ma prevalentemente con la laccasi;
- IV. Include quei funghi che rilasciano solo la lignina perossidasi;
- V. Costituito da quelle specie fungine non ancora completamente caratterizzate.

2. PARTE SPERIMENTALE

La linea di ricerca del presente lavoro è inserito nell'ambito del laboratorio per la ricerca industriale, l'innovazione e il trasferimento tecnologico denominato ENVIREN (*Environmental Regional Network*) facente parte della rete regionale per l'Alta Tecnologia della Regione Emilia-Romagna. Nell'ambito di tale programma l'attività è stata focalizzata sulla valorizzazione energetica degli scarti agro-alimentari dell'industria enologica e cerealicola attraverso tecnologie per la bioraffinazione delle matrici vegetali con tecniche d'idrolisi meccanica e biologica con lo scopo di creare un meccanismo di filiera per la valorizzazione del biofuel (biogas) ottenibile da fermentazioni successive.

Le risorse disponibili da tali filiere e utilizzabili per una valorizzazione energetica sono rappresentate da vinacce, graspi (o raspi) e vinaccioli per l'industria enologica e dalla paglia per l'industria cerealicola in quanto sottoprodotti delle filiere agro-alimentari emiliano-romagnole. Oggi tale attività è stata inglobata negli obiettivi del Centro Interdipartimentale per la Ricerca Industriale ENERGIA&AMBIENTE.

Scarti agroalimentari dell'industria cerealicola

Nei cereali la parte della pianta utilizzata a scopo alimentare è il frutto secco indeiscente definito anche "cariosside", importante per l'alto contenuto in amido, che rappresenta il polisaccaride di riserva di moltissime piante superiori. La paglia è invece il prodotto agricolo costituito dai fusti dei cereali alla fine della maturazione della pianta e può essere considerato come un sottoprodotto dell'agricoltura, perché è ciò che rimane dei cereali con la trebbiatura, dopo che la granaglia è stata raccolta, e risulta uno dei sottoprodotti agricoli maggiormente presenti in Italia. La quota di gran lunga più elevata di produzione spetta alla paglia di frumento seguita da quella di riso, orzo, avena e segale. Circa la metà della produzione rimane sul campo, dove viene interrata per migliorare la fertilità del suolo, una parte è destinata principalmente come elemento integrativo per foraggi animali o come lettiera sul pavimento delle stalle. In misura minore viene impiegata dall'industria cartiera per la produzione della carta paglia e cellulosa o per l'industria micologica. La paglia di frumento in particolare è il maggiore scarto agricolo prodotto in Europa e il secondo prodotto a livello mondiale ⁹¹

Le caratteristiche chimiche della paglia sono riassunte nella tab 2.1⁹²

	composizione (gr/kg)
umidità	76
sostanza secca (s.s)	924
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s)	
lignina	81,5
cellulosa	498
emicellulosa	269
ceneri	69
estratto etereo	9
proteina grezza	20
altra sostanza organica	53,5

Tab 2.1 *Composizione chimica della paglia*

In virtù dello scarso valore nutritivo copre un ruolo nella dieta animale come apportatrice di fibra nella razione ma per aumentarne tale valore spesso si fa uso di tecniche di trattamento meccanico. La sua struttura lignocellulosica la rende particolarmente resistente all'idrolisi enzimatica per cui sono necessari pretrattamenti per rendere più accessibile la struttura e facilitare così l'idrolisi dei carboidrati complessi che costituiscono le cellule dei cereali in monomeri semplici. I cereali sono monocotiledoni e hanno una struttura cellulare ricca di polisaccaridi fermentescibili. Una tipica cellula di monocotiledone possiede infatti una parete cellulare costituita al 25% da cellulosa, al 55% da emicellulosa e da solo un 10% di pectina (figura 2.1).

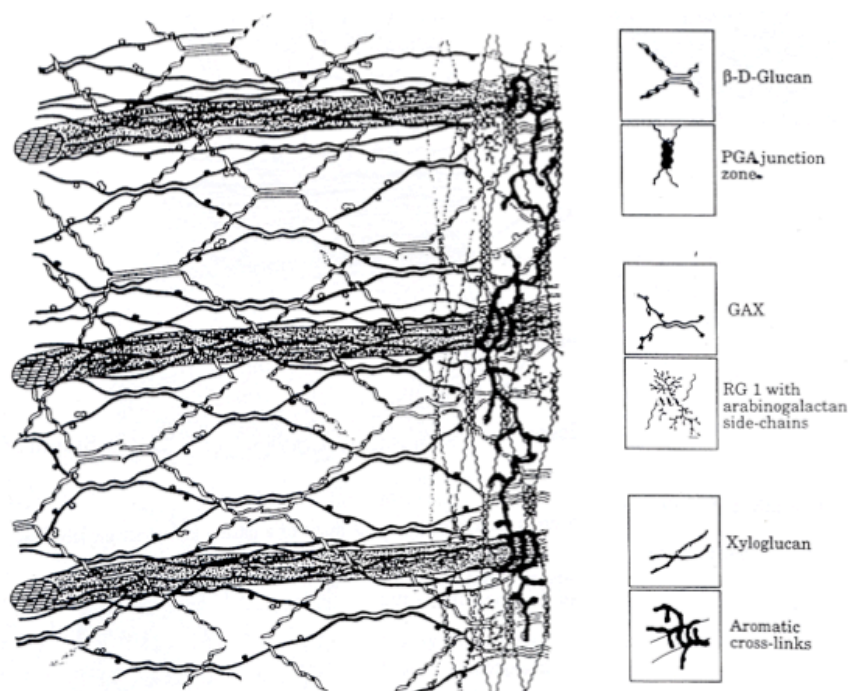


Fig 2.1 La rappresentazione schematica di una parete cellulare di monocotiledone⁹³

Prendendo in considerazione la famiglia dei cereali, la frazione polisaccaridica principale delle loro pareti cellulari è costituita da arabinoxilani. Gli arabinoxilani consistono in una catena polisaccaridica principale la cui unità monomerica è xilano (legami β -1,4), alla catena principale sono legati lateralmente residui di α -L-arabinofuranosio via legami α -(1,3) e/o α -(1,2).

Scarti agroalimentari dell'industria enologica

La produzione del vino prevede una fase di ammostatura o pigiatura delle uve in cui si attua la rottura degli acini per ottenere la rapida liberazione del mosto senza lacerare le bucce e i vinaccioli che costituiscono la vinaccia che può essere dolce o fermentata. La vinaccia dolce (o vergine), è caratterizzata dalla presenza di zuccheri fermentescibili per cui viene spesso utilizzata per trasformazioni alcoliche in cui lieviti selezionati trasformano gli zuccheri in alcol. La vinaccia si definisce invece fermentata quando tutti gli zuccheri sono stati convertiti in alcool.

La composizione chimica della vinaccia subisce variazioni con l'andamento stagionale, la varietà del vitigno, il luogo di provenienza, l'epoca di vendemmia e le tecniche di vinificazione utilizzate. I contenuti medi delle vinacce sono riportati nella tabella 2.2

SOSTANZA	% IN PESO
Acqua	50-70
Cellulosa	10-20
Zuccheri	6-8
Grassi	2-4
Acidi organici	1-2
Tannini	1-2
Sostanze minerali	1-2

Tab 2.2 *Composizione chimica media della vinaccia* ⁹⁴

I vinaccioli rappresentano in peso il 25 % della vinaccia e vengono spesso considerati componenti passivi della massa, sia nel processo fermentativo che in quello di distillazione. Ciò è essenzialmente dovuto al fatto che possedendo una robusta epidermide ed una particolare forma a cuneo difficilmente si rompono durante le fasi di lavorazione e hanno un endosperma ricco di olio dal quale si ricava l'olio di vinacciolo.

Alla fase di pigiatura segue la diraspatura per allontanare i graspi (o raspi), che costituiscono la parte legnosa del grappolo che ne consente il collegamento con la pianta. La composizione chimica del grapo è riportata nella tabella 2.3

	composizione (gr/kg)
umidità	690
sostanza secca (s.s)	310
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s)	
lignina	230
cellulosa	235
emicellulosa	159
ceneri	80

	composizione (gr/kg)
proteina grezza	32
altra sostanza organica	264

Tab 2.3 Composizione chimica dei raspi d'uva

Una rappresentazione schematica del processo di vinificazione è riportata in figura 2.1.

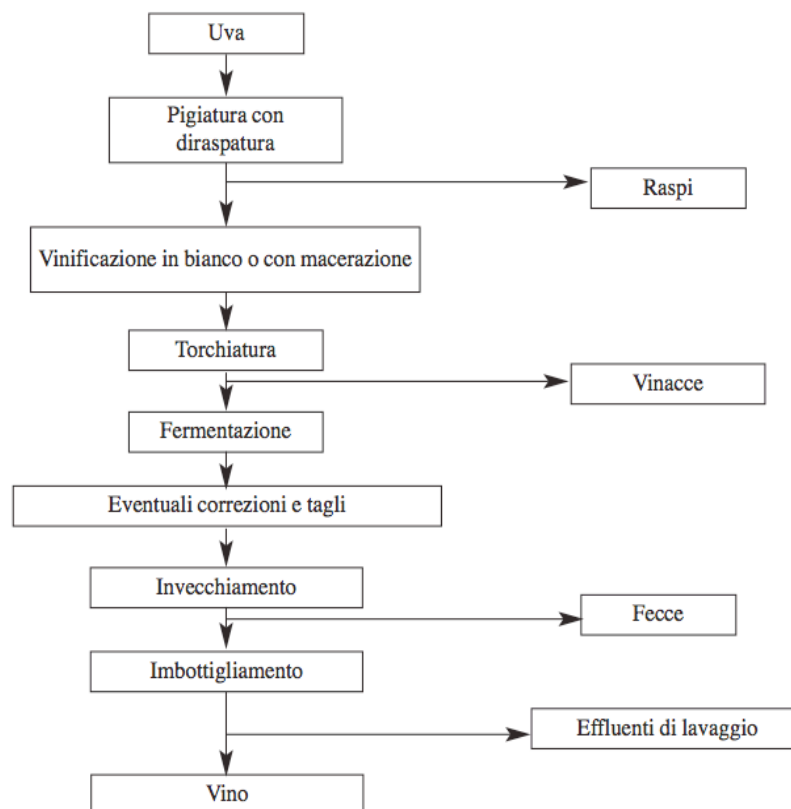


Fig 2.1 Schema riassuntivo del processo di produzione del vino

Il bilancio di massa del processo di vinificazione ed i relativi materiali in ingresso e prodotti, sottoprodotti ed effluenti in uscita è riassunto nella tabella 2.4 (ANPA/ONR 1999)

Tipologia del materiale		Quantità (kg)
In entrata		
	Uva	100,0
	Acqua	141,0
In uscita		
	Acque reflue	143,0
	Vinacce	13,0
	Raspi	2,2
	Vini di torchiatura	5,0
	Fecce e fanghi di filtrazione	3,6
	Vetro	0,2
	Vino	74,0

Tab 2.4 Bilancio dei materiali in ingresso ed uscita nel processo di vinificazione⁹⁵

Dalla tabella 2.4 si evince che raspi, vinacce e vinaccioli rappresentano circa il 25% del peso per ettolitro di vino prodotto, ma a differenza delle vinacce che rappresentato un substrato facilmente metabolizzabile, per raspi e vinaccioli sono necessari pre-trattamenti specifici che aumentino la capacità degradativa di enzimi e batteri su tali substrati e che renderebbero utilizzabili i polisaccaridi costitutivi della vite, pianta dicotiledone. Una tipica cellula di dicotiledone infatti possiede una parete cellulare costituita al 30% da cellulosa, al 30% da emicellulosa, al 35% di pectina e da un 1-5% di proteine strutturali (figura 2.2).

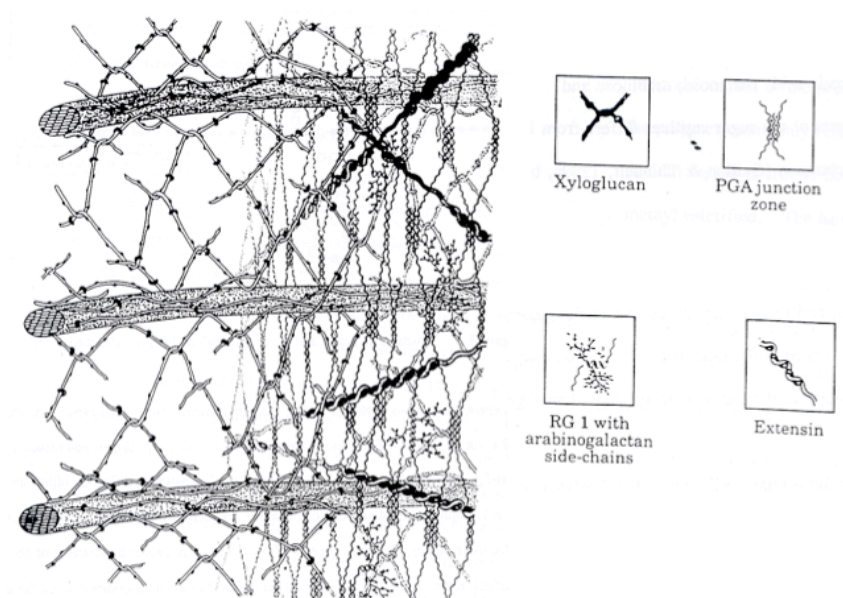


Fig 2.2 Rappresentazione schematica di una parete cellulare di dicotiledone

Pre-trattamenti su substrati ligno-cellulosici

I processi biochimici che portano alla produzione di biogas hanno una fase limitante nella fase idrolitica di degradazione dei polisaccaridi che costituiscono le biomasse sottoposte a processi fermentativi. Lo step idrolitico diventa tanto più lento quanto la biomassa ha una struttura ligno-cellulosica che ne impedisce la degradabilità anaerobica, seppure tali scarti siano costituiti da polisaccaridi altamente fermentabili che posso essere biotrasformati per produrre prodotti con alto valore aggiunto come il biogas. Nei processi per substrati ligno-cellulosici viene tradizionalmente adottato un approccio che prevede un pre-trattamento della struttura fibrosa della biomassa che renda i polisaccaridi maggiormente accessibili alla conversione biochimica^{96,97} prima del processo fermentativo che porta poi alla formazione di biogas (figura 2.3)

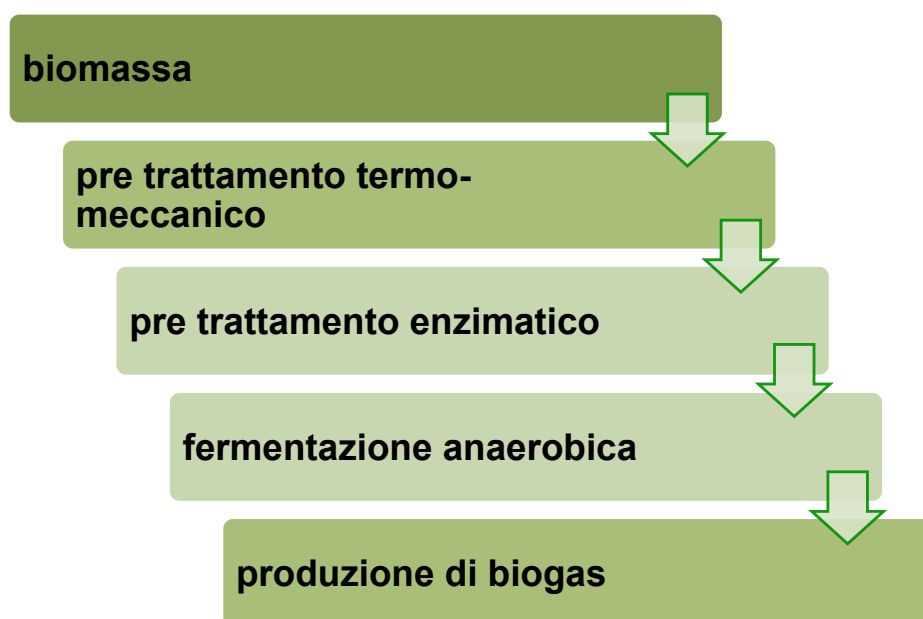


Fig 2.3 Schema di un trattamento sequenziale della biomassa a monte del processo fermentativo per la produzione di biogas

Pre-trattamenti termo-meccanici

La valorizzazione dei sottoprodotti agro-industriali presi in esame non può prescindere da pretrattamenti che ne consentano il loro utilizzo come materiale d'elezione per la produzione di biocombustibili. I trattamenti analizzati devono consentire una buona destrutturazione della biomassa al fine di costituire un prodotto liquefatto in grado di

essere facilmente degradabile microbiologicamente in fermentazioni anaerobiche per la produzione di biogas.

Tali operazioni consentono di attenuare una lunga fase d'idrolisi enzimatica ad opera dei microrganismi idrolitici coinvolti nella prima fase del processo di digestione anaerobica e di fornire materiale immediatamente utilizzabile per i batteri acidogeni che effettuano l'ossidazione dei substrati organici semplici a piruvato, trasformato successivamente in acidi grassi volatili, alcoli e chetoni, che fungono da substrati di partenza per la successiva fase acetogenica. Su tale base viene analizzata, in prima analisi, la possibilità di aumentare la disponibilità di zuccheri fermentescibili dalla paglia, sottoprodotto dell'industria cerealicola che ha una scarsa produzione di biogas se utilizzata tal quale⁹⁸, essendo costituita prevalentemente da materiale ligno-cellulosico di difficile degradazione in processi fermentativi.

Un buon pretrattamento della biomassa è diretto a disorganizzare la struttura della parete cellulare e a separare la cellulosa e l'emicellulosa dalla lignina al fine di aumentare la superficie disponibile per successivi trattamenti di tipo enzimatico e rendere tali polisaccaridi reale fonte di zuccheri fermentabile nei processi biologici ^{11 99,100.101}(figura 2.4)

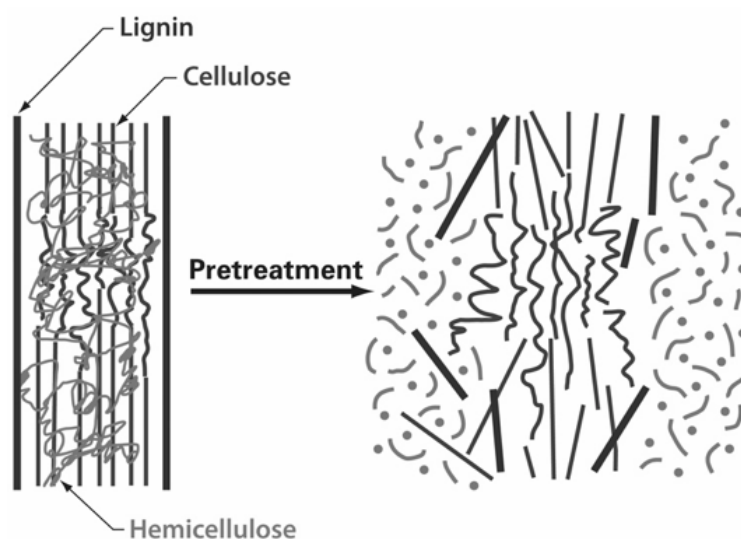


Fig 2.4 Rappresentazione schematica della destrutturazione della matrice vegetale con pre-trattamento (mod. da Hsu et al. 1980 ¹⁰¹)

La fase di pretrattamento deve essere finalizzata a ottimizzare la suscettibilità della

biomassa all'idrolisi enzimatica, caratteristica fortemente dipendente dall'operazione adottata per il conseguimento del risultato. Uno dei processi maggiormente adottati per aumentare la bio-disponibilità di cellulosa è la lisi termo-meccanica della biomassa tramite l'azione combinata di un trattamento termico e l'utilizzo di un estrusore a coclea in cui l'energia meccanica provoca lo sminuzzamento, schiacciamento e la frantumazione del materiale. Sulla base di queste nozioni è stato pensato uno scale-down del processo di lisi termo-meccanica, seguito da un trattamento enzimatico per aumentare la disponibilità di zuccheri fermentescibili del materiale utilizzato.

Un tipico sistema di pre-trattamento meccanico in scala industriale prevede un passaggio preliminare della biomassa in un estrusore meccanico con coclee controrotanti che ne provoca un'azione di sminuzzamento e frantumazione prima che questa venga immessa nel sistema fermentativo in cui avviene la digestione anaerobica (figura 2.5).

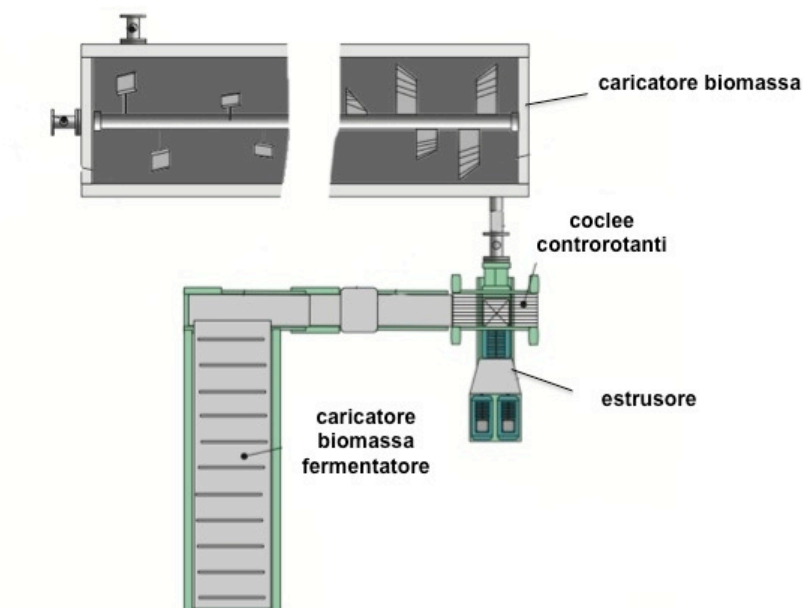


Fig 2.5 Schema di trattamento meccanico con estrusore meccanico in un sistema industriale

Pre-trattamenti enzimatici

Considerando questioni di tipo ambientale e logistiche, un ruolo fondamentale nel rendere tali substrati maggiormente fermentescibili è svolto dagli enzimi che operano tagli molecolari altamente specifici, in condizioni blande e soprattutto in ambiente acquoso. A tale scopo sono disponibili commercialmente prodotti costituiti da mix enzimatici specifici per il trattamento di biomasse ligno-cellulosiche, oggi più spesso formulate per aumentare la concentrazione di zuccheri in soluzione nei processi industriali per la produzione di etanolo.¹⁰²

Attualmente la produzione di enzimi per applicazioni industriali è molto elevata ed è prevalentemente finalizzata alla produzione di enzimi destinati al settore alimentare, anche se negli ultimi anni le più grandi aziende produttrici, stimolate dal crescente interesse per l'utilizzo di fonti rinnovabili di energia, hanno rivolto la loro attenzione verso la produzione di cocktail enzimatici per il trattamento delle biomasse destinate ad uso energetico. La composizione enzimatica, le condizioni e i costi sono differenti per ogni soluzione adottata dalla casa produttrice e la loro efficacia dipende dalla fonte di biomassa e dalle condizioni dei pre-trattamenti. Tali prodotti vengono posti in commercio come additivi tecnologici per un uso specifico e sono ottenuti per via fermentativa da ceppi batterici o fungini. Diverse specie microbiche, soprattutto fungine, producono infatti enzimi idrolitici come xilanasi, pectinasi e cellulasi per idrolizzare componenti strutturali della parete cellulare vegetale delle piante e tali attività possono essere utilizzate per destrutturare pareti cellulari come quelle della paglia e dei grappi d'uva che hanno un'alta percentuale di lignina. Tale lignina è in grado di legare una grande quantità di cellulosa ed emicellulosa che potrebbe essere invece disponibile nei processi di conversione biochimica.

La reale attività delle varie classi enzimatiche presenti nei prodotti commercializzati può non corrispondere precisamente all'attività per la quale il prodotto viene commercializzato, talvolta perché facente parte di un kit di prodotti con attività complementari o a volte sovrapponibili tra di loro. Per utilizzare tali prodotti nel trattamento di paglia e grappi si rende necessaria una caratterizzazione puntuale di prodotti commercializzati dai due grandi leader mondiali per la produzione di enzimi industriali: Novozymes e Danisco.

Ognuno dei prodotti presi in considerazione è indicato specificatamente per l'idrolisi di biomasse ligno-cellulosiche in processi industriali che portano alla produzione di bioetanolo.

Screening e caratterizzazione di prodotti enzimatici commerciali

Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del prodotto commerciale Novozymes.

Nella valutazione di un prodotto per il pre-trattamento su scala industriale, occorre una caratterizzazione che identifichi le principali attività idrolitiche coinvolte nell'idrolisi di tutte le principali strutture polisaccaridiche delle pareti cellulari vegetali. Per valutare un preparato enzimatico ai fini di un suo impiego come pre-trattamento di biomasse ligno-cellulosiche è più funzionale una caratterizzazione che preveda la determinazione delle principali attività carboidrasiche, al fine di poter idrolizzare tutte le principali strutture polisaccaridiche dei vegetali. Nella valutazione delle varie attività enzimatiche, risulta più utile verificare il numero di legami scissi dalle classi di enzimi presenti in ogni prodotto, attraverso la quantificazione di zuccheri riducenti con il metodo dell'ADNS¹⁰³ piuttosto che la determinazione di ogni tipologia di oligosaccaride idrolizzato. Le attività carboidrasiche di ogni prodotto sono state valutate su diversi substrati modello (amido, xilano e pectina) per verificare l'azione complessiva di tutte le attività enzimatiche presenti nel prodotto commerciale. Le performance del prodotto vengono stimate in termini di attività amilasica, pectinasica e xilanasica ovvero per la loro capacità di degradare le componenti polisaccaridiche più importanti della parete cellulare della cellula vegetale. Le attività pectinasica, amilasica e xilanasica, vengono determinate dosando la concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati con il metodo dell'ADNS, utilizzando come substrati specifici delle soluzioni allo 0,3% p/v di pectina e all'1% p/v di amido e xilano, rispettivamente.

Il prodotto Novozymes preso in esame si presenta in diversi formulati enzimatici liquidi, ognuno con attività enzimatiche specifiche segnalate dal produttore:

- **NS-50013** (*cellulasi*)
- **NS-50010** (β -glucosidasi)
- **NS-50012** (β -glucanasi, *cellulasi, emicellulasi, pectinasi e xilanas*)
- **NS-50030** (*xilanas*)
- **NS-22002** (β -glucosidasi, *xilanas*)

Taluni di questi preparati derivano da fermentazioni di ceppi selezionati di *Aspergillus aculeatus* e *Humicola insolens* già caratterizzati in bibliografia per l'elevata capacità di produrre enzimi in grado di idrolizzare substrati specifici, in particolare *Humicola*

insolens è caratterizzato per le elevate capacità xilanasiche¹⁰⁴.

Nei processi di digestione anaerobica su scala industriale sono talvolta presenti fasi di idrolisi, in fermentatori dedicati, separate fisicamente dalle altre fasi che coinvolgono l'intero processo biologico. Tali fasi avvengono in condizioni di pH intorno a 5 e in condizioni di temperatura intorno a 40 °C. Per tale motivo risulta fondamentale caratterizzare ogni prodotto enzimatico destinato al trattamento delle biomasse in questa fase del processo e in tali condizioni operative, perché in tale fase avverrebbe l'utilizzo del prodotto enzimatico.

La possibilità di testare ogni prodotto a diluizioni progressive, da 20 a 2000, consente di stabilire anche una efficacia massima d'idrolisi alla diluizione considerata, valutando contestualmente la convenienza economica dell'intero processo. I complessi enzimatici sono stati caratterizzati misurando la relativa attività amilasica, xilanasica e pectinasica dopo aver trattato enzimaticamente ogni substrato per 3 minuti a 40°C. Dopo aver verificato l'efficacia dell'enzima (diluito 1 a 100) sul substrato di riferimento viene misurata l'attività specifica del preparato enzimatico in funzione della sua concentrazione, espressa come diluizione. I tempi di misurazione dell'attività enzimatica sono volutamente mantenuti molto bassi perché prolungando i tempi di incubazione la concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione non risulta aumentare in maniera lineare per tempi superiori a 10 minuti. Tale comportamento, osservato per tutti i preparati anche per le attività pectinasica e amilasica, è probabilmente dovuto a processi di inibizione da prodotto che generalmente accomunano gran parte delle carboidrasi.

La verifica puntuale delle attività enzimatiche massime di ogni prodotto analizzato su substrati modello sono riportati nella tabella 2.5

Prodotto	Utilizzo commerciale	attività max $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$		
		amilasica	xilanasica	pectinasica
NS-50013	cellulasi	0,23	0,42	0,15
NS-50010	β -glucosidasi	0,94	0,05	0,27
NS-50012	β -glucosidasi, cellulasi, emicellulasi, pectinasi, xilnasi	2,33	1,04	1,02
NS-50030	xilnasi	0,11	0,42	0,14

NS-22002	β -glucosidasi, xilanasi	0,10	0,62	0,16
-----------------	-----------------------------------	------	------	------

Tab 2.5 Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 5 e 40°C (esprese in μmol (di substrato caratteristico rilasciato) * ml^{-1} (enzima utilizzato) * min^{-1}) nei diversi preparati commerciali analizzati.

Tutti i prodotti hanno delle attività enzimatiche multiple e spesso l'attività enzimatica prevalente è quella dichiarata dal produttore. Dai risultati ottenuti è possibile trarre alcune conclusioni relativamente alle attività specifiche di ogni prodotto analizzato:

NS-50013: prodotto commercializzato come cellulasi e i dati riportati mostrano una discreta resa del complesso enzimatico prevalentemente come xilanasi. Per riscontrare un'attività amilasica occorre aumentare la concentrazione dell'enzima durante il trattamento.

NS-50010: prodotto con discreta resa sull'amido, risulta il più performante tra i prodotti presi in esame su questa matrice. Mostra una scarsa attività su matrici come pectina e xilano.

NS-50012: prodotto commercializzato come un complesso multi enzimatico contenente un ampio range di carboidrati che includono: β -glucosidasi, cellulasi, emicellulasi, pectinasi e xilanasi. Tra i prodotti esaminati risulta l'unico ad avere una efficacia idrolitica sulla pectina.

NS-50030: venduto come endo-xilanasi con alta specificità per pentosani solubili ma su questo substrato risultati più performanti si hanno con l'NS-22002. L'idrolisi su amido e pectina è quasi nulla.

NS-22002: prodotto commercializzato come una miscela di β -glucosidasi e xilanasi. I risultati migliori si hanno sulla matrice xilano, mentre scarsi sono sui substrati amido e pectina. L'attività xilanasica è la più alta riscontrata tra i prodotti utilizzati per lo screening.

Nei grafici seguenti vengono comparate le attività specifiche dei prodotti commerciali presi in esame.

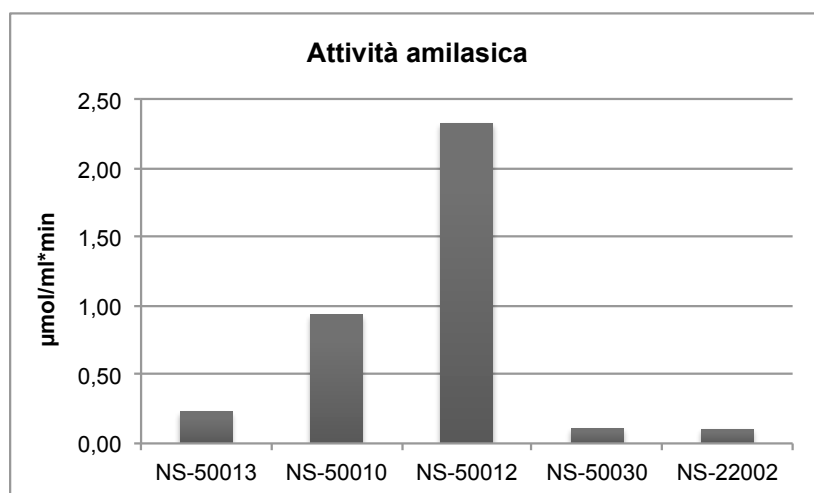


Fig 2.6 Comparazione dell'attività amilasica determinate a pH 5 e 40°C tra i prodotti Novozymes condotta su substrato di amido all'1% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

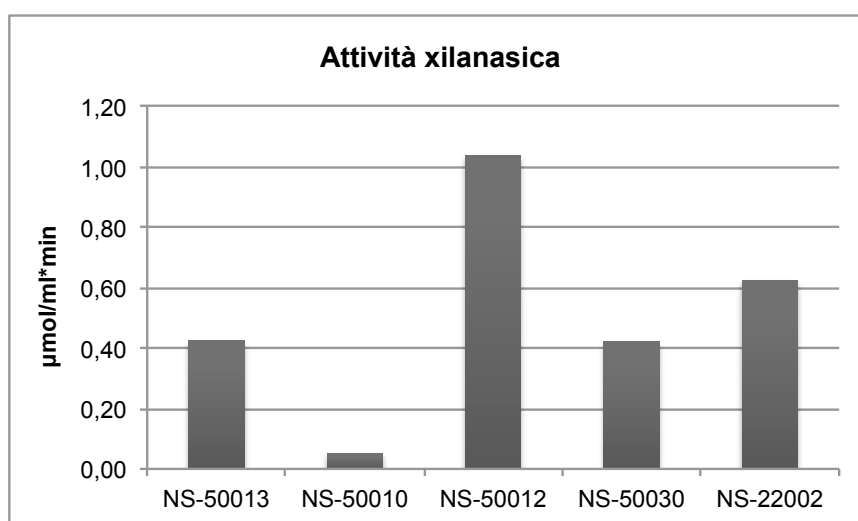


Fig 2.7 Comparazione dell'attività xilanasica determinate a pH 5 e 40°C tra i prodotti Novozymes condotta su substrato di xilano all'1% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

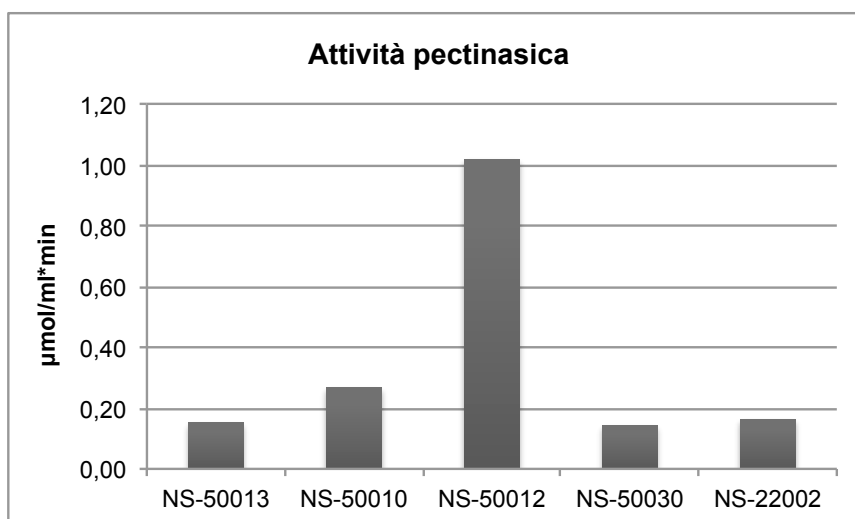


Fig 2.8 Comparazione dell'attività pectinasica determinate a pH 5 e 40°C tra i prodotti Novozymes condotta su substrato di pectina allo 0,3% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

La necessità di effettuare trattamenti enzimatici su substrati ligno-cellulosici rende necessaria anche l'individuazione dell'attività di tali enzimi ad idrolizzare polimeri di cellulosa. Per tale motivo si rende necessario testare ogni prodotto per la capacità idrolitica specifica su tale substrato. L'utilizzo di substrati solubili come amido, xilano e pectina permette di valutare alcune attività enzimatiche specifiche di ogni prodotto, ma per la determinazione dell'attività cellulasica occorre adoperare una metodica lievemente diversa rispetto alle precedenti. La metodica pone qualche limite alla misurazione che risulta legata al metodo utilizzato, in quanto la cellulosa è un polimero generalmente insolubile in acqua. La misura di attività cellulasica viene quindi eseguita in due fasi, in cui la prima fase prevede il trattamento enzimatico di un rettangolo di cellulosa (carta da filtro) di 1 g in una soluzione contenente l'enzima. L'azione di ogni prodotto su tale substrato viene valutata dal punto di vista visivo per indagare il tipo e il grado di disgregazione che il substrato subisce dopo 20 ore di trattamento come suggerito da Wood e Bahat¹⁰⁵ per una valutazione complessiva dell'effetto idrolitico del preparato enzimatico. Le figure 2.9 e 2.10 mostrano la differenza tra i fogli di cellulosa integri e quelli destrutturati dal trattamento idrolitico.

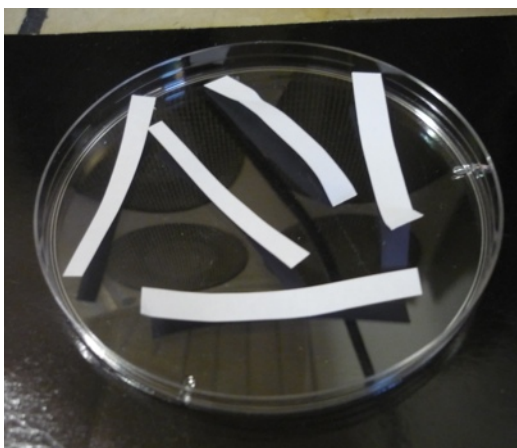


Fig 2.9 A sinistra fogli di cellulosa non sottoposti a trattamento enzimatico con cellulasi; nella **fig 2.10** di destra: fogli di cellulosa idrolizzati dal trattamento enzimatico

Dopo aver effettuato una misura di attività visiva di degradazione fisica del substrato di cellulosa viene effettuata anche una valutazione di attività enzimatica con metodologia analoga a quella utilizzata per l'individuazione di attività sui substrati amido, xilano e pectina a pH 5 e temperatura di 40°C.

Le attività idrolitiche sui fogli di cellulosa è riassunta nella tabella 2.6

Prodotto	Utilizzo commerciale	Idrolisi fisica del foglio di cellulosa	Attività cellulase max $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$
NS-50013	cellulasi	foglio completamente degradato	11,24
NS-50010	β -glucosidasi	nulla	0,72
NS-50012	β -glucosidasi, cellulasi, emicellulasi, pectinasi, xilanasi	nulla	9,58
NS-50030	xilanasi	nulla	0,70
NS-22002	β -glucosidasi, xilanasi	nulla	9,07

Tab 2.6 Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 5 e 40°C (esprese in μmol (di glucosio rilasciato) $\cdot \text{ml}^{-1}$ (enzima utilizzato) $\cdot \text{min}^{-1}$) nei diversi preparati commerciali analizzati.

Tra i prodotti utilizzati soltanto l'NS-500013 è in grado di degradare fisicamente il foglio di carta, probabilmente per un'elevata azione endo-cellulasica in grado di destrutturare velocemente la matrice fibrosa e liquefacendola. Le analisi condotte sull'NS-50012 e l'NS-22002 mostrano comunque alti livelli di zuccheri liberi in soluzione ed elevate attività, segno di un'idrolisi efficace anche in questo caso. L'azione idrolitica degli enzimi presenti in NS-50012 e NS-22002 pare sia di tipo eso-cellulasica, quindi in grado di liberare in breve tempo monomeri terminali della catena polisaccaridica, ma di scarso impatto sull'alterazione dell'intera struttura dei polimeri costituenti il foglio di cellulosa (figura 2.11).

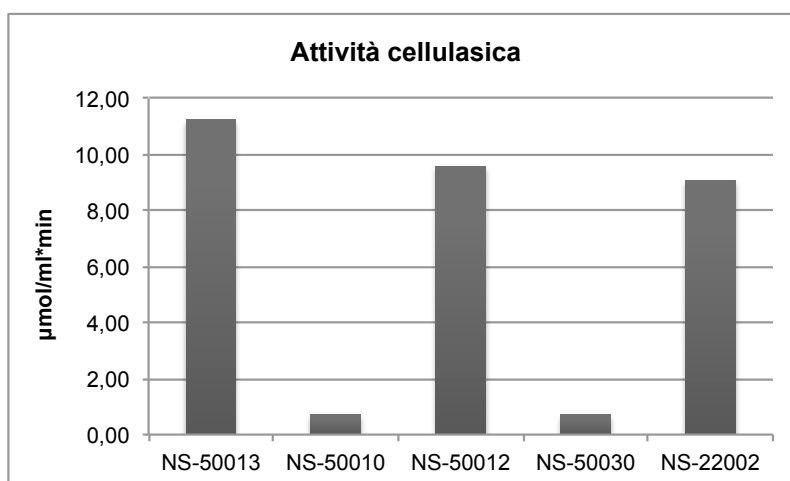


Fig 2.11 Comparazione dell'attività cellulasica determinate a pH 5 e 40°C tra i prodotti Novozymes condotta su 1 gr di cellulosa a pH 5 ed enzima diluito 1:100

Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del prodotto commerciale Genencor.

Genencor è presente sul mercato con un prodotto per il trattamento di biomasse ligno-cellulosiche che prende il nome di Accelerase 1500. Il preparato enzimatico Accelerase 1500, è caratterizzato da una dichiarata attività eso- ed endo-cellulasica, β -glucosidasi, ed è ottenuto per fermentazione da *Trichoderma reesei*, fungo filamentoso considerato tra i più efficienti produttori di cellulasi^{106,107}. Oltre a tale prodotto vengono valutati anche altri formulati enzimatici che commercialmente sono definiti "accessori" alle attività enzimatiche specifiche del prodotto "base" Accelerase

1500 e che Genencor dichiara siano destinati allo sviluppo di processi su piccola scala, per la maggiore ed efficiente conversione di pentosi ed esosi nella produzione di bioetanolo:

- Accelerase XY (*xilanas*)
- Accelerase XC (*xilanas*, *cellulas*)
- Accelerase BG (β - *glucosidas*)

Il preparato enzimatico Accelerase XC, a differenza degli altri preparati, è ottenuto per fermentazione da *Penicillium funiculosum* noto in letteratura per la capacità metabolica di produrre cellulasi^{108,109,110}

La verifica puntuale delle attività enzimatiche di ogni prodotto sono riportate nella tabella 2.7

Prodotto	Utilizzo commerciale	Attività max $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$		
		amilasica	xilanasica	pectinasica
Accelerase 1500	exocellulasica, endocellulasica, β -glucosidasica	0,13	0,16	0,22
Accelerase BG	β -glucosidasica	1,78	2,67	0,61
Accelerase XY	xilanasica	0,17	3,23	0,23
Accelerase XC	xilanasica/cellulasica	0,33	2,93	0,30

Tab 2.7 Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 5 e 40°C (esprese in μmol (di substrato caratteristico rilasciato) $\cdot \text{ml}^{-1}$ (enzima utilizzato) $\cdot \text{min}^{-1}$) nei diversi preparati commerciali analizzati.

Le attività enzimatiche dell'Accelerase 1500 risultano piuttosto basse rispetto ad attività specifiche più importanti per i prodotti accessori presi in esame:

Accelerase BG: sviluppato come prodotto accessorio per prodotti carenti in β -glucosidasi e agisce sinergicamente ad altri enzimi nell'aumentare il rilascio di glucosio fermentabile. E' il prodotto accessorio con il più ampio spettro di attività tra quelli presi in esame, avendo una buona attività sia su amido che su pectina e xilano.

Accelerase XY: ha una buona attività xilanasica, mentre risulta inferiore quella

xilanasica e pectinasica.

Accelerase XC: prodotto concepito per l'idrolisi di xilano e cellulosa, difatti mostra una buona attività per il primo substrato mentre è scarsa l'attività sugli altri substrati.

Nei grafici seguenti vengono comparate le attività specifiche dei prodotti commerciali presi in esame.

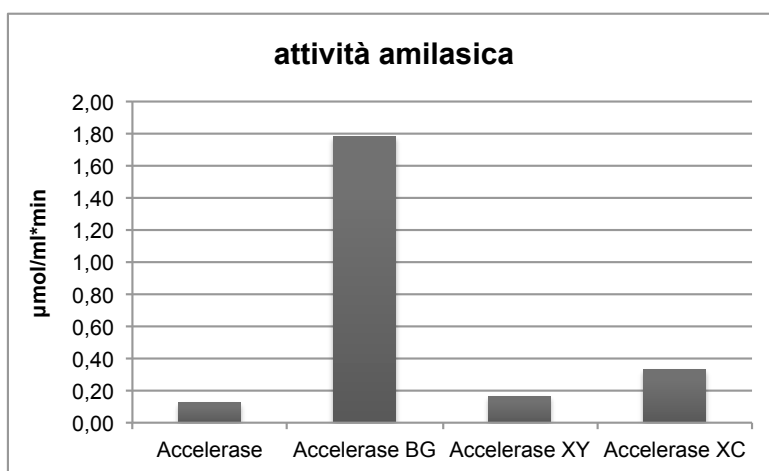


Fig 2.11 Comparazione dell'attività amilasica tra i prodotti Genencor condotta su substrato di amido all'1% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

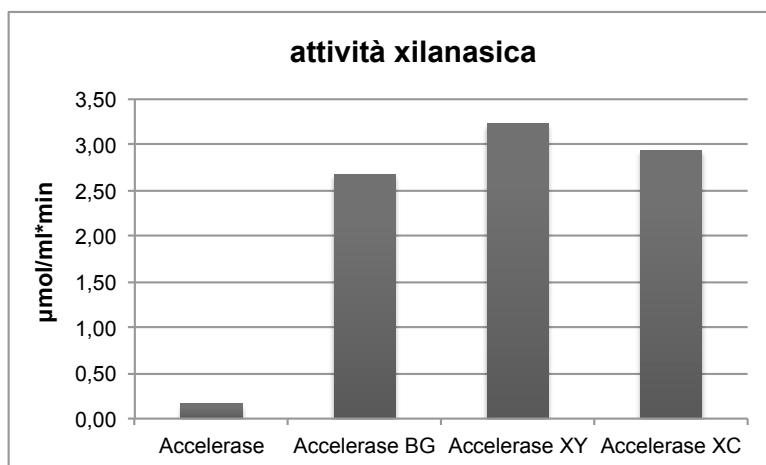


Fig 2.12 Comparazione dell'attività xilanasica tra i prodotti Genencor condotta su substrato di xilano all'1% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

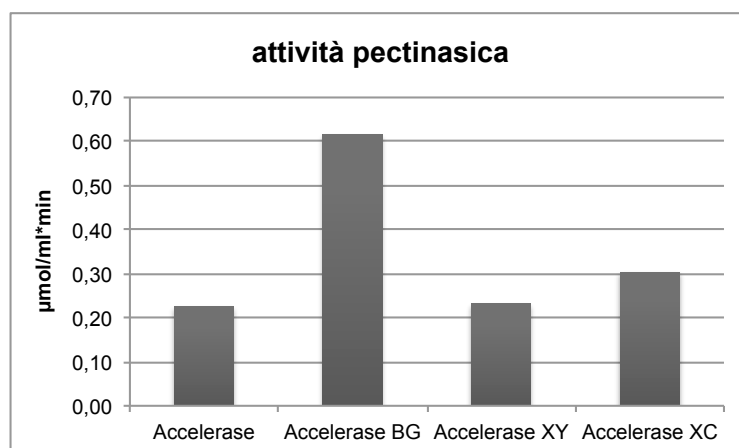


Fig 2.13 Comparazione dell'attività pectinasica tra i prodotti Genencor condotta su substrato di pectina allo 0,3% a pH 5 ed enzima diluito 1:100

L'analisi delle attività cellulasiche richiede anche in questo caso una valutazione visiva dell'idrolisi fisica di fogli di cellulosa e una misura puntuale delle attività enzimatiche come riassunto in tabella 2.8.

Prodotto	Utilizzo commerciale	Idrolisi fisica del foglio di cellulosa	attività cellulastica max $\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}$
Accelerase 1500	exocellulasica, endocellulasica, β -glucosidasica	foglio completamente degradato	8,61
Accelerase BG	β -glucosidasica	nulla	8,39
Accelerase XY	xilanasica	nulla	3,02
Accelerase XC	xilanasica/cellulasica	nulla	1,75

Tab 2.8 Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 5 e 40°C (espresse in μmol (di glucosio rilasciato) $\cdot \text{ml}^{-1}$ (enzima utilizzato) $\cdot \text{min}^{-1}$) nei diversi preparati commerciali analizzati.

Tra i prodotti presi in esame soltanto l'Accelerase 1500 è in grado di degradare completamente il foglio di cellulosa utilizzato per il test analitico mentre Accelerase BG ha una buona attività cellulastica seppure il prodotto non degrada minimamente il

substrato utilizzato. I prodotti Accelerase XY e XC hanno entrambi una bassa attività su tale substrato sebbene XC abbia una dichiarata attività di tipo cellulasica, oltre che xilanasica (figura 2.14)

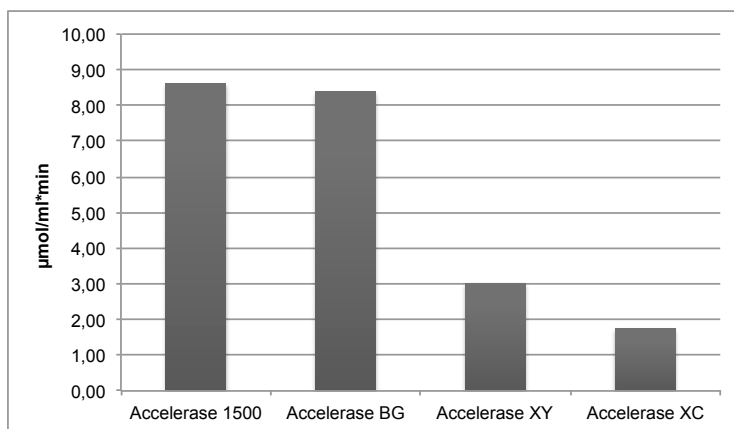


Fig 2.14 Comparazione dell'attività cellulasica determinate a pH 5 e 40°C tra i prodotti Genencor condotta su 1 gr di cellulosa a pH 5 ed enzima diluito 1:100

In virtù di considerazioni economiche fatte considerando uno scale-up del processo su volumi diversi da quelli comunemente pensate nell'ambito di un indagine di laboratorio, è stato eseguito un più ampio screening di attività enzimatica del prodotto Accelerase 1500. Tra tutti i prodotti presi in esame quest'ultimo appare più diffusamente applicabile in impianti pre-industriali in virtù del basso costo per litro di prodotto.

In relazione ai dati di stabilità ottimale forniti dal produttore, l'indagine viene estesa a temperature di 50°C e 60°C rispetto a quella di 40°C, temperatura alla quale l'attività dell'Accelerase 1500 sembra non essere ottimale (tabella 2.9)(figura 2.15)

Temperatura	attività amilasica μmol/ml*min	attività xilanasica μmol/ml*min	attività pectinasica μmol/ml*min
40°C	0,13	0,16	0,22
50°C	0,15	1,54	0,53
60°C	0,49	1,53	0,50

Tab 2.9 Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 5 a 40°C, 50°C e 60°C, (esprese in μmol (di glucosio rilasciato) * ml⁻¹ (enzima utilizzato) * min⁻¹) nei diversi preparati commerciali analizzati.

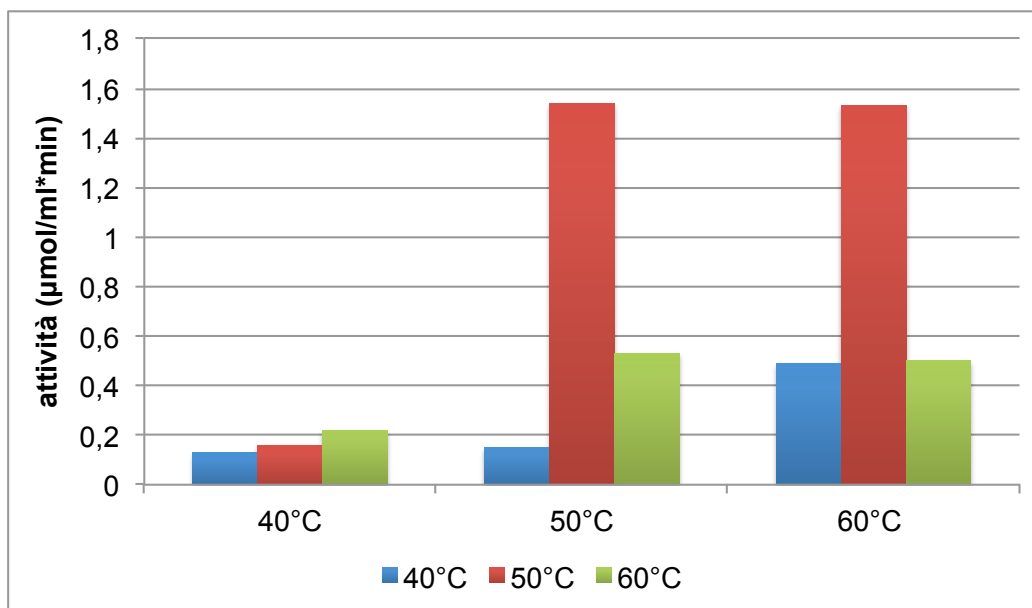


Fig 2.15 Attività amilasica, xilanasica e pectinasica di Accelerase 1500 a temperatura di 40°C, 50°C, 60°C e a pH 5 ed enzima diluito 1:100

Dopo aver determinato le attività enzimatiche a diverse temperature si è tentato di capire quale fosse la stabilità enzimatica a temperature di lavoro ottimali di 50°C e 60°C. La prova viene condotta considerando come riferimento l'attività enzimatica massima (valore fissato come 100%) mentre le attività misurate nelle prove a tempi successivi sono espresse come percentuale del valore massimo.

Alla temperatura di 50°C utilizzando come substrato di reazione l'amido il tempo di mezza vita è pari 110 minuti. (figura 2.16)

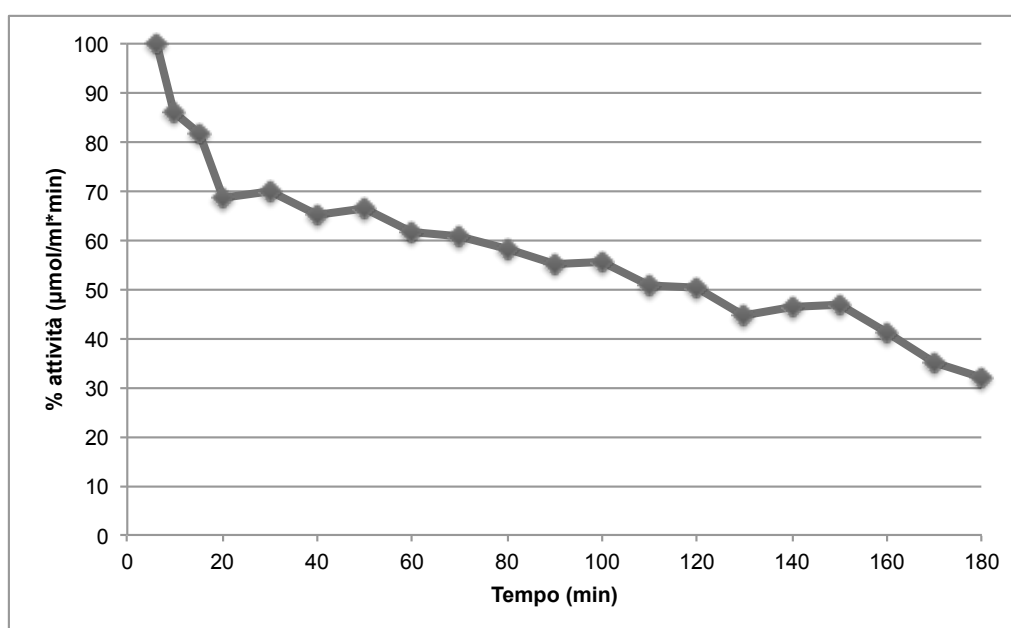


Fig 2.16 Diminuzione dell'attività amilasica in funzione del tempo di permanenza

dell'enzima a 50°C e pH 5 ed enzima diluito 1:100

Utilizzando lo xilano come substrato di reazione si nota un raggiungimento del tempo di mezza vita dell'attività xilanasica più rapido poiché questo viene raggiunto dopo 40 minuti (figura 2.17)

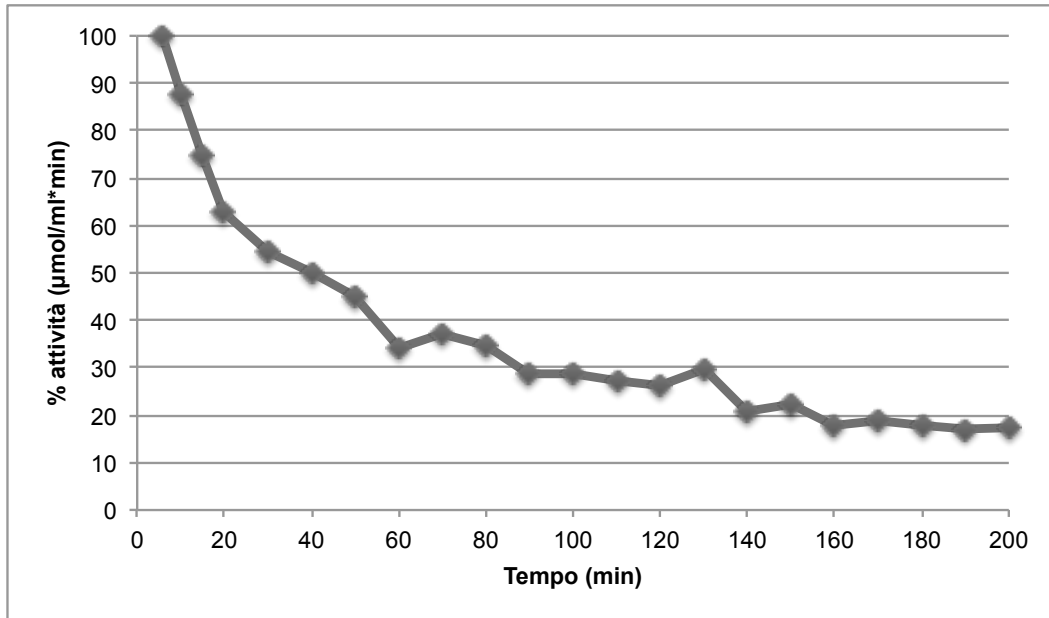


Fig 2.17 Diminuzione dell'attività xilanasica in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a 50°C e pH 5 ed enzima diluito 1:100

Alla temperatura di 60°C sul substrato amido invece (figura 2.18) il tempo di mezza vita è pari a 60 minuti

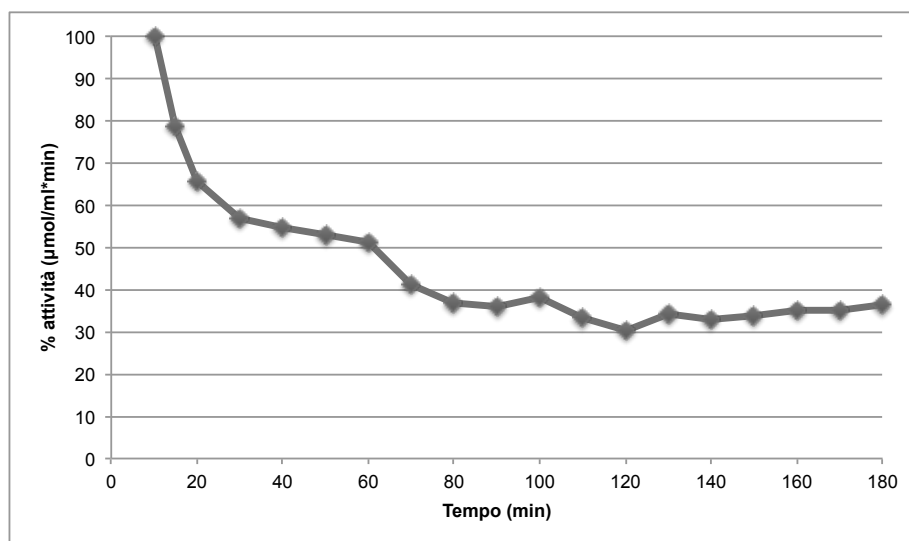


Fig 2.18 Diminuzione dell'attività amilasica in funzione del tempo di permanenza

dell'enzima a 60°C e pH 5 ed enzima diluito 1:100

Su substrato xilano, alla temperatura di 60°C, il tempo di mezza vita è pari a 25 minuti (figura 2.19) con un decremento più rapido rispetto a quello registrato nel caso dell'attività amilasica alla stessa temperatura.

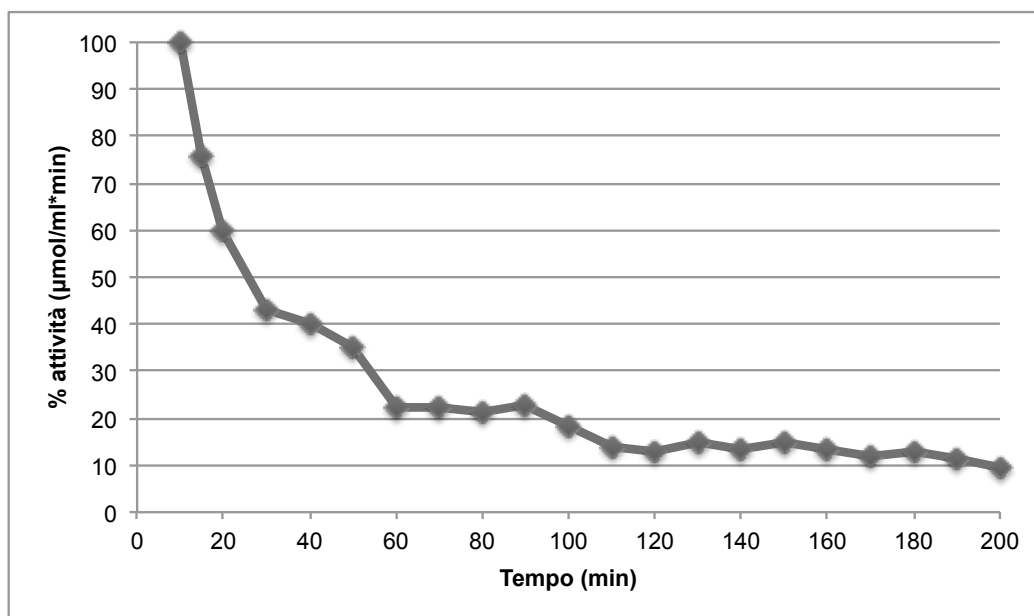


Fig 2.19 *Diminuzione dell'attività xilanasica in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a 60°C e pH 5 ed enzima diluito 1:100*

A causa di problemi di gelificazione della pectina non è stato possibile trarre delle conclusioni soddisfacenti su tale substrato.

Confrontando il rilascio di zuccheri riducenti in un tempo di reazione pari a 10 minuti sui substrati modello di riferimento, si rendono evidenti le diminuzioni repentine di attività enzimatica verificate con la misura del tempo di mezza di vita delle attività amilasiche e xilanasiche a 50°C e 60°C.

I grafici in figura 2.20, 2.21 e 2.22 mostrano il rilascio di zuccheri riducenti sui substrati amido, xilano e pectina nei primi 10 minuti di reazione normalizzando le concentrazioni di zuccheri riducenti rilasciati.

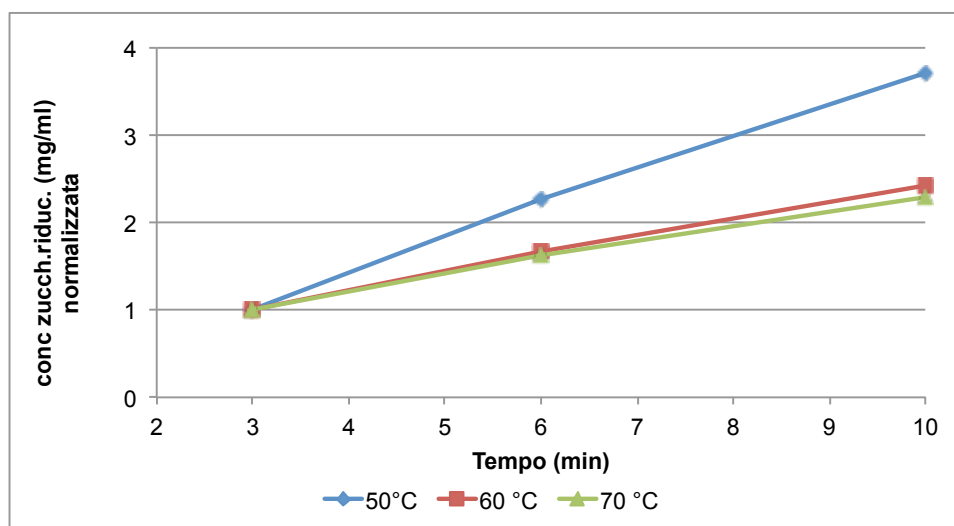


Fig 2.20 Rilascio di zuccheri riducenti nei primi 10 minuti di reazione enzimatica condotta su substrato di amido allo 0,3% a pH 5 ed enzima diluito 1:100 (dati normalizzati)

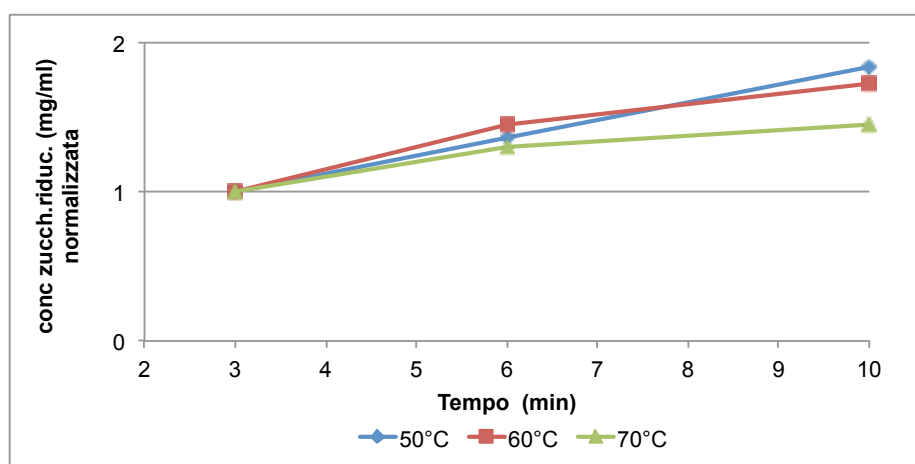


Fig 2.21 Rilascio di zuccheri riducenti nei primi 10 minuti di reazione enzimatica condotta su substrato di xilano allo 0,3% a pH 5 ed enzima diluito 1:100 (dati normalizzati)

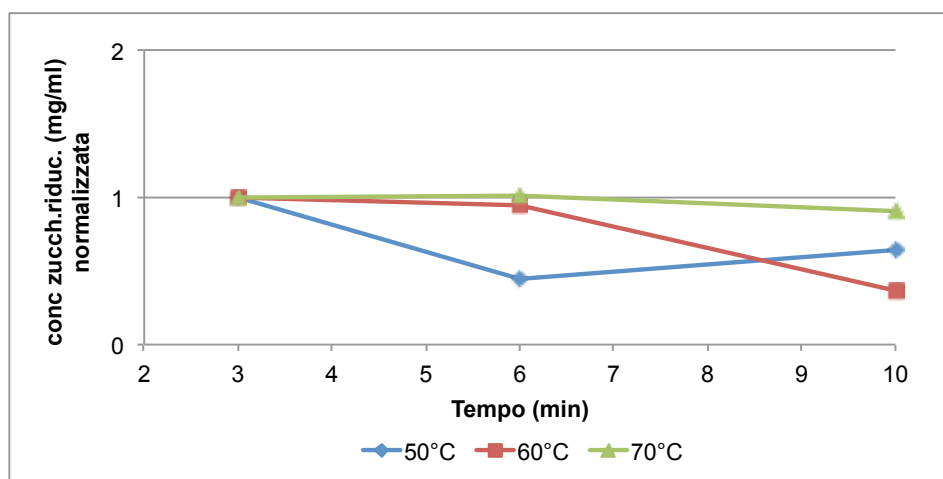


Fig 2.22 Rilascio di zuccheri riducenti nei primi 10 minuti di reazione enzimatica condotta su substrato di pectina allo 0,1% a pH 5 ed enzima diluito 1:100 (dati normalizzati)

Alle temperature esaminate pare esserci un rilascio maggiore di zuccheri riducenti con temperature di reazione pari a 50°C, evidenziato soprattutto nel caso del trattamento dell'amido, in accordo con quanto messo in evidenza anche dal tempo di raggiungimento del tempo di mezza vita per le attività amilasiche a temperature di 50°C e 60°C.

L'indagine sulla pectina è invece apparsa più difficoltosa a causa della scarsa riproducibilità delle analisi, probabilmente dovuta alla tendenza a gelificare della pectina a temperature più elevate.

In un ottica di applicazione industriale di Accelerase 1500 per il pre-trattamento enzimatico occorre individuare la diluizione massima utilizzabile di prodotto per avere attività enzimatiche tali da giustificare tale tipo di trattamento.

L'approccio prevede di valutare l'attività enzimatica alla temperatura di 50°C per un tempo di 6 minuti con diluizioni progressive di Accelerase 1500 per verificarne l'attività fino a che questa non diventi nulla.

Si può individuare un'attività amilasica del prodotto con diluizioni fino a 1:200 (figura 2.23), mentre per diluizioni maggiori non si ha un'attività enzimatica apprezzabile.

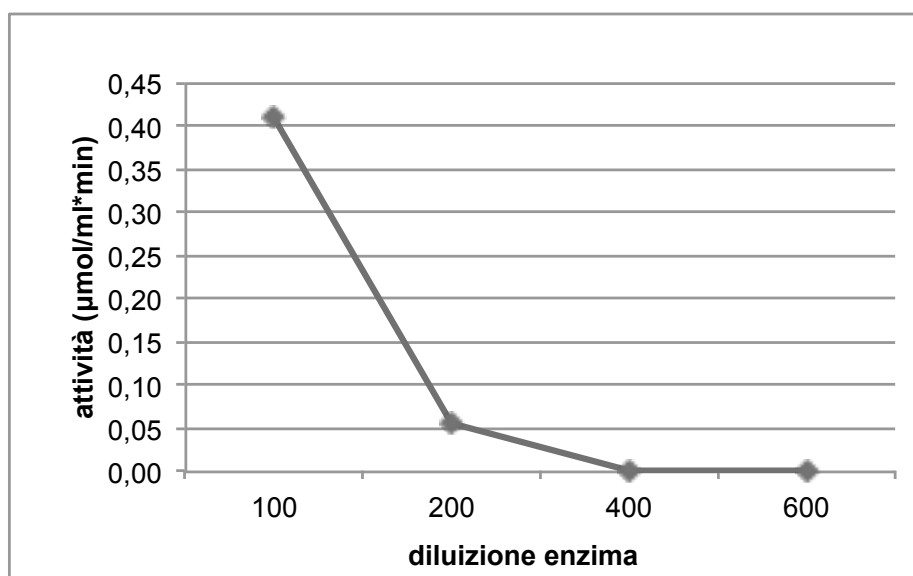


Fig 2.23 Effetto della diluizione dell'enzima sull'attività amilasica del prodotto a 50°C e pH 5

L'attività xilanasica si riscontra fino a diluizioni 1:1000 del prodotto, mentre per diluizioni maggiori non si hanno attività xilanasiche apprezzabili dal test utilizzato (figura 2.24)

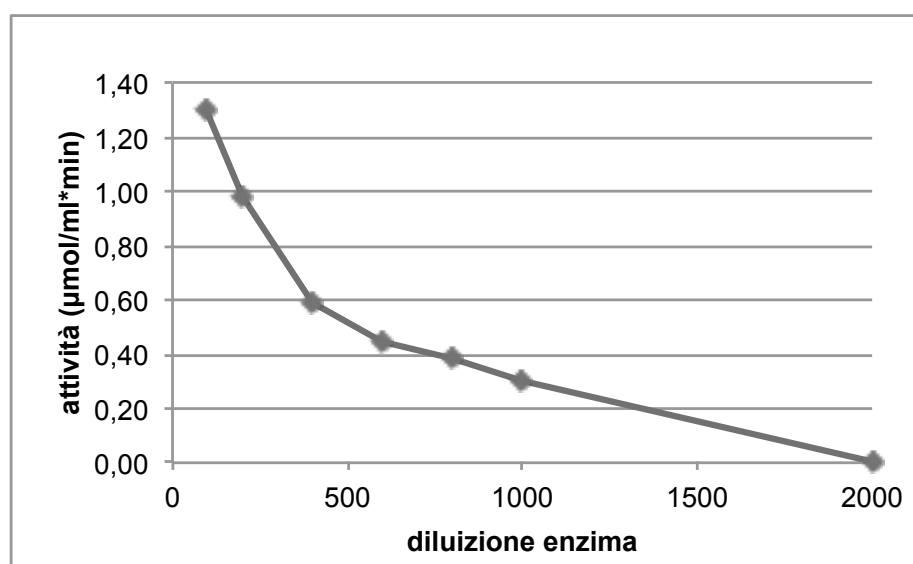


Fig 2.24 Effetto della diluizione dell'enzima sull'attività xilanasica del prodotto a 50°C e pH 5

Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria cerealicola

Sulla base dei dati ottenuti dopo lo screening enzimatico dei prodotti commerciali analizzati, ed in seguito ad una valutazione economica di un potenziale scale-up del processo di trattamento enzimatico della biomassa, vengono effettuati dei test sulla paglia come se fossero stadi fisici simili al processo di estrusione ed enzimatici. Dopo lo screening enzimatico dei formulati di Novozymes e Genencor è stato deciso di utilizzare l'enzima Accelerase 1500 per le prove di idrolisi enzimatica della biomassa presa in esame.

Il trattamento meccanico previsto per il campione di paglia prevede un trattamento meccanico mediante frullatura al fine di ottenere un prodotto più omogeneo e favorire i successivi step idrolitici. Il campione di paglia così ottenuto viene risospeso in acqua e sottoposto ad un trattamento termico di sterilizzazione in autoclave (121°C, 21 minuti) per favorire l'ingresso di acqua nelle maglie dei tessuti vegetali grazie alla gelificazione delle componenti polisaccaridiche facilitando i successivi processi di idrolisi enzimatica¹¹¹. Il trattamento consente inoltre di limitare eventuali fenomeni di fermentazione dovuti alla presenza di microflora batterica nel campione che altererebbero l'effetto di idrolisi enzimatica, monitorata analizzando il rilascio di zuccheri in soluzione¹¹². Dopo il trattamento in autoclave alcuni campioni vengono sottoposti ad un trattamento meccanico con estrusore a coclea per destrutturare fisicamente la struttura ligno-cellulosica del campione di paglia.

La differenza fisica del materiale dopo un trattamento di estrusione è visibile in figura 2.25



Fig 2.25 Campione di paglia pre-estrusione (sinistra) e post-estrusione (destra)

Valutazione preliminare del trattamento enzimatico su paglia estrusa

L'efficacia del trattamento enzimatico su un substrato ligno-cellulosico ricco in lignina viene resa valida da un trattamento preliminare di 60 minuti su paglia estrusa per verificare l'azione dell'Accelerase 1500 su substrati diversi da quelli tradizionalmente utilizzati per lo screening del prodotto (figura 2.26). La prova viene effettuata ad una temperatura di 50°C in agitatore orbitale e ad intervalli regolari viene analizzata la concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione mediante saggio con ADNS.

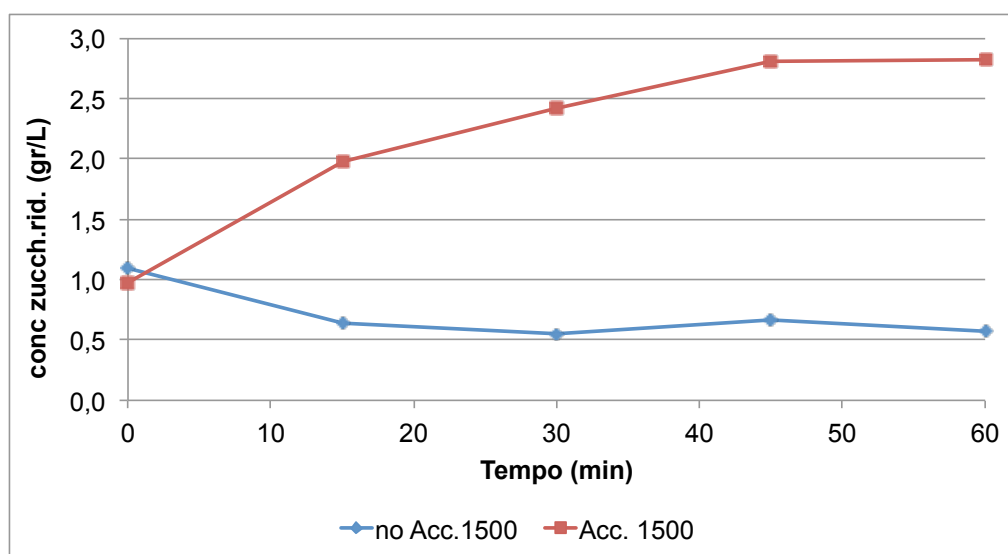


Fig 2.26 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del tempo su un campione di paglia estrusa a temperatura di 50°C per 60 minuti.

Dal grafico risulta evidente l'azione enzimatica di Accelerase 1500 già dopo 10 minuti di incubazione del prodotto in agitatore orbitale, mentre nel campione di paglia di controllo (senza enzima) non si ha alcun incremento di zuccheri liberi in soluzione.

Trattamenti termo-meccanici ed enzimatici combinati su paglia

Occorre però verificare ogni azione combinata del trattamento termo-meccanico con il trattamento enzimatico e per tale motivo vengono realizzate prove in cui sono previste diverse combinazioni di trattamento della biomassa presa in esame (tabella 2.10):

paglia non estrusa, senza Accelerase 1500
paglia non estrusa, con Accelerase 1500
paglia estrusa, senza Accelerase 1500
paglia estrusa, con Accelerase 1500

Tab 2.10 Combinazione dei trattamenti presi in esame su campioni di paglia

Ogni test viene effettuato ad una temperatura di 50°C in agitatore orbitale per 180 minuti e ad intervalli regolari viene analizzata la concentrazione di zuccheri riducenti. In figura 2.27 sono riportati i risultati ottenuti confrontando la diversa combinazione tra i trattamenti presi in esame e mediante l'utilizzo di una percentuale di Accelerase 1500 pari a 0,25% sul peso umido del campione dopo il trattamento in autoclave, laddove questo viene utilizzato. Le concentrazioni iniziali al tempo 0 (inizio della prova) non sono mai identiche tra i diversi campioni presi in esame a causa della diversa solubilizzazione di zuccheri iniziali dopo il trattamento in autoclave e il trattamento meccanico tra una prova e l'altra. Per tale motivo i dati sono normalizzati ad un concentrazione iniziale di 1 gr/L di zuccheri riducenti.

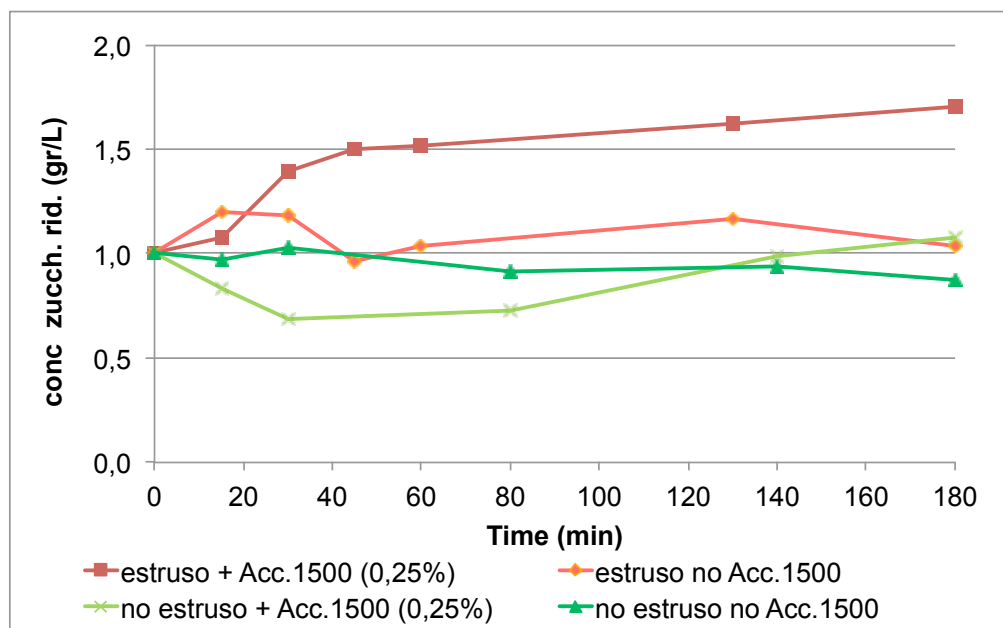


Fig 2.27 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su paglia ad una temperatura di 50°C per 180 minuti

La figura 2.27 mette in risalto l'azione combinata del trattamento termo-meccanico con quello enzimatico per effetto della maggiore superficie disponibile all'enzima per

un'idrolisi specifica sulla struttura ligno-cellulosica della paglia. Ciò è reso evidente da un'azione enzimatica molto bassa laddove Accelerase 1500 viene utilizzato su campioni non sottoposti a trattamento termo-meccanico. La tabella 2.11 evidenzia la differenza percentuale tra le concentrazioni iniziale di zuccheri in soluzione e dopo 180 minuti.

Trattamento	diff. % concentrazione iniziale/finale
paglia non estrusa, senza Accelerase 1500	-13%
paglia non estrusa, con Accelerase 1500	7%
paglia estrusa, senza Accelerase 1500	-19%
paglia estrusa, con Accelerase 1500	85%

Tab 2.11 *Differenza percentuale tra la concentrazione iniziale di zuccheri riducenti e al termine della prova*

Laddove non viene utilizzato Accelerase 1500 si assiste invece ad una diminuzione di zuccheri riducenti in soluzione probabilmente dovuta ad iniziali contaminazioni microbiologiche dell'ambiente di reazione.

Avendo appurato la necessità di effettuare un trattamento di tipo termo-meccanico per aumentare le capacità idrolitiche del prodotto enzimatico commerciale utilizzato per le prove, si è reso necessario utilizzare tale prodotto con diverse percentuali rispetto al peso umido del campione dopo il trattamento in autoclave per verificare una eventuale proporzionalità tra la percentuale di enzima utilizzato e l'idrolisi del campione trattato:

- Accelerase 0,1% v/p
- Accelerase 0,5% v/p
- Accelerase 5 % v/p

Di seguito sono riportati i dati ottenuti confrontando il trattamento su paglia a 50°C per 180 minuti su un campione estruso di paglia e su un campione estruso di paglia con l'aggiunta di Accelerase pari a 0,1% (figura 2.28), 0,5% (figura 2.29), 5% (figura 2.30) su peso umido del campione.

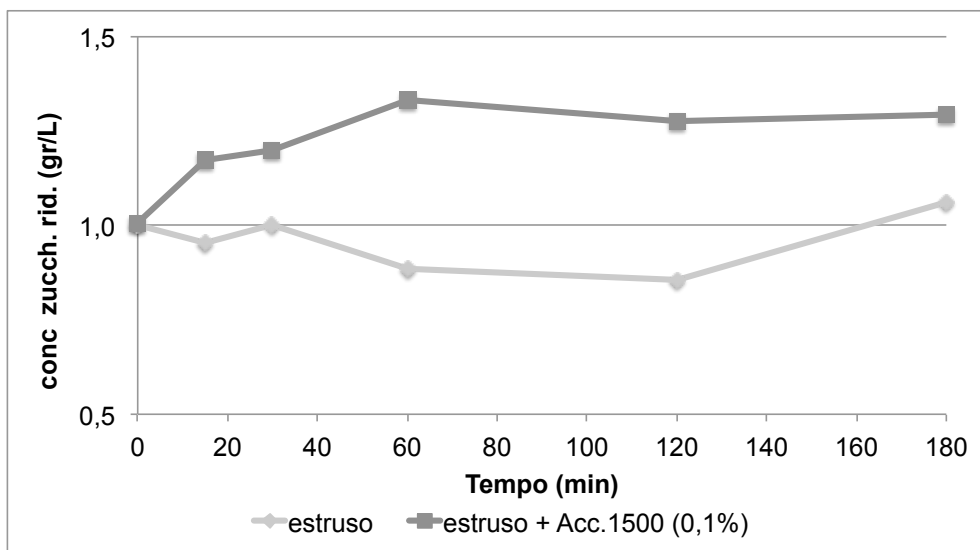


Fig 2.28 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su paglia estrusa ad una temperatura di 50°C per 180 minuti con Accelerase 1500 pari a 0,1% (dati normalizzati ad un concentrazione iniziale di 1 gr/L di zuccheri riducenti)

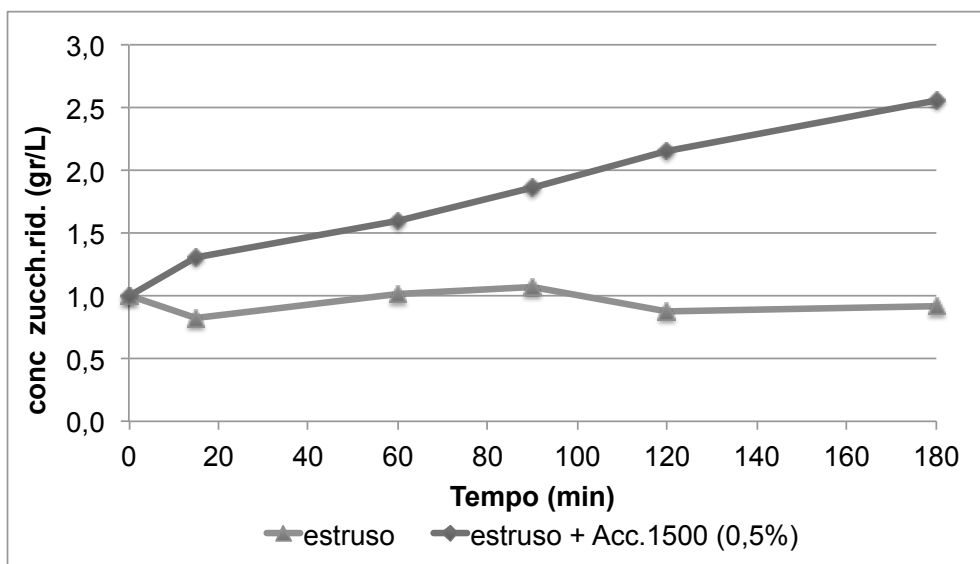


Fig 2.29 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su paglia estrusa ad una temperatura di 50°C per 180 minuti con Accelerase 1500 pari a 0,5% (dati normalizzati ad un concentrazione iniziale di 1 gr/L di zuccheri riducenti)

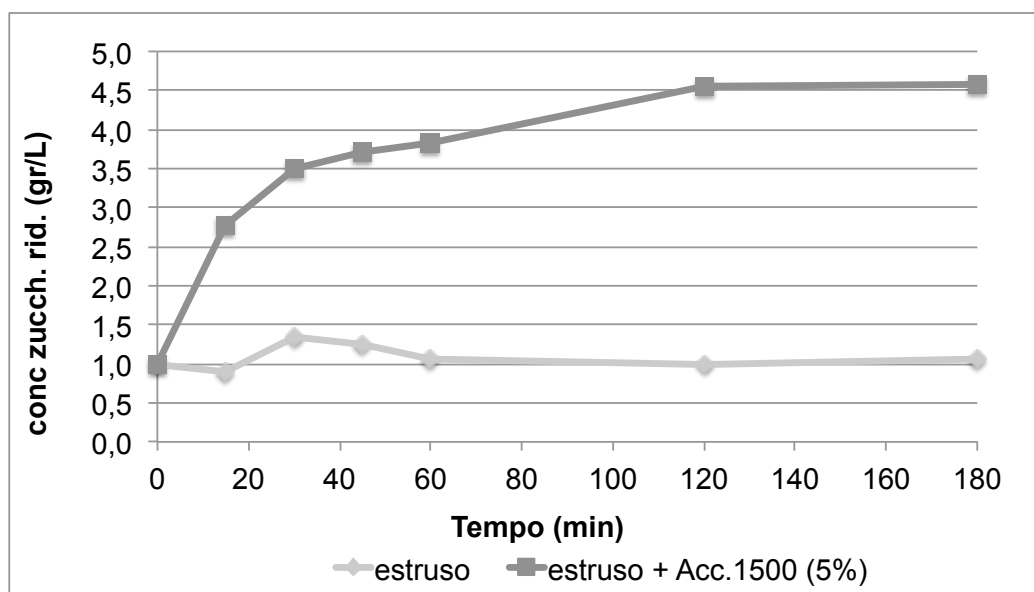


Fig 2.30 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su paglia estrusa ad una temperatura di 50°C per 180 minuti con Accelerase pari a 5% (dati normalizzati ad un concentrazione iniziale di 1 gr/L di zuccheri riducenti)

Dal confronto tra le differenti percentuali di Accelerase 1500 utilizzato nelle diverse prove si può mettere in evidenza una discreta proporzionalità tra l'incremento di zuccheri riducenti in soluzione e la percentuale di enzima utilizzato per il trattamento (figura 2.31).

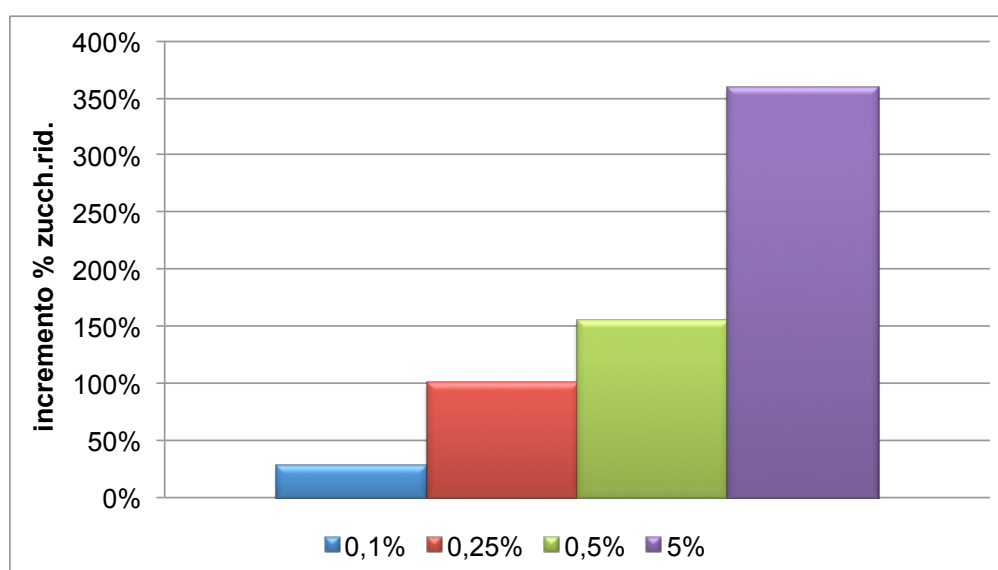


Figura 2.31 Incremento percentuale di zuccheri riducenti in test su paglia estrusa con

diverse percentuali di Accelerase 1500 a temperatura di 50°C dopo 180 minuti di reazione.

Occorre fare considerazioni di tipo economico per valutare l'effettivo beneficio derivante dall'idrolisi della matrice utilizzata e il costo reale del trattamento enzimatico. Dalle prove effettuate appare però evidente che un trattamento di tipo enzimatico su matrici ligno-cellulosiche con alto contenuto in lignina come la paglia ha un'alta efficienza se realizzato insieme a trattamenti termo-meccanici che alterino fortemente la struttura fisica della paglia.

Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria enologica

L'utilizzo di sottoprodotti dell'industria enologica con caratteristiche assimilabili a biomasse di tipo ligno-cellulosico come i raspi d'uva, pone dei problemi relativi all'utilizzo di polisaccaridi fermentescibili come emicellulose e cellulose in processi fermentativi, seppure questi siano presenti in tali sottoprodotti^{113,114}. I raspi d'uva non sottoposti ad alcun tipo di pre-trattamento presentano scarse produzioni in termini di biogas, a causa del loro elevato contenuto in lignina¹¹⁵, che come evidenziano diversi studi, non viene degradata durante il processo fermentativo¹¹⁶.

Per tale motivo si rende necessario investigare metodiche di trattamento termo-meccanico ed enzimatico su matrici di questo tipo per aumentare la produzione specifica di biogas della matrice presa in esame. Tali pretrattamenti devono però essere bilanciati per ridurre il loro impatto sui costi del trattamento stesso, dei processi di downstream e controbilanciare i costi operativi e i costi della biomassa^{117,118}, sebbene questi ultimi siano bassi trattandosi di sottoprodotti derivanti da processi agro-alimentari.

Si ricorre pertanto alla valutazione sia di trattamenti termo-meccanici che enzimatici su raspi d'uva (GU) per valorizzarne il contenuto energetico ai fini della produzione di biogas. Per dimostrare l'efficacia di entrambi i trattamenti su tale matrice vengono effettuate prove sperimentali su raspi d'uva appartenenti a residui di lavorazione della raccolta dell'anno 2009.

Caratterizzazione dei graspi utilizzati per le prove sperimentali

I graspi vengono conservati a tre differenti temperature ($0 \pm 0,5$ °C, $4 \pm 0,5$ °C e 37 ± 1 °C) e al riparo dalla luce, ottenendo in questo modo tre diverse tipologie di graspi a seconda dello stato di conservazione: GU I ($0 \pm 0,5$ °C), GU II ($4 \pm 0,5$ °C) e GU III (37 ± 2 °C). Differenti aliquote della stessa tipologia di prodotto vengono miscelate insieme per ridurre le differenze in termini di composizione chimica e per ottenere un prodotto più omogeneo. Confrontando le tre tipologie di graso per la quantità di zuccheri iniziali presenti dopo tre mesi di conservazione, emergono differenze riconducibili proprio alla diversa conservazione del prodotto. Le modalità di conservazione a 4°C e 37°C portano allo sviluppo di fermentazioni spontanee in maniera diversificata, tanto che a temperature di conservazione maggiori (37°C) i graspi subiscono un maggior grado di degradazione biologica, come è evidenziato dalla diversa quantità di zuccheri semplici liberi analizzati (tabella 2.12) dopo aver sottoposto il campione ad un trattamento termico in autoclave (121°C, 21min) per solubilizzare gli zuccheri presenti nei tre prodotti presi in esame.

Tipologia di conservazione	concentrazione (gr/L) di zuccheri dopo solubilizzazione in autoclave
GU I ($0 \pm 0,5$ °C)	$8,3 \pm 0,2$
GU II ($4 \pm 0,5$ °C)	$3,1 \pm 0,5$
GU III (37 ± 2 °C)	$2,1 \pm 0,3$

Tabella 2.12 Zuccheri riducenti solubilizzati dopo trattamento in autoclave a 121°C per 21 minuti in graspi conservati a diverse temperature

Trattamenti termici, meccanici ed enzimatici combinati su graspi d'uva

Dopo aver valutato le differenze tra le matrici prese in esame occorre verificare l'efficacia di diverse tipologie di trattamento su substrati che presentano delle caratteristiche differenti.

Il trattamento termico viene pensato per facilitare il successivo trattamento meccanico ed enzimatico di idrolisi con Accelerase 1500. Durante il trattamento termico i graspi vengono sottoposti a trattamento in autoclave così che la parte lignocellulosica, prima con le emicellulose e dopo lentamente con la cellulosa, inizi a solubilizzare^{119,120,121}. Il trattamento meccanico, effettuato dopo il trattamento termico, è invece pensato per

ridurre la dimensione delle particelle e la cristallinità del graspo^{122,123} mediante l'utilizzo di un estrusore a coclea rotante e favorire quindi il successivo step d'idrolisi con bassi dosaggi d'enzima e in un tempo di bioconversione più corto. La valutazione di efficacia dell'Accelerase 1500 viene fatta solamente laddove il test richieda l'utilizzo di tale forma di trattamento, utilizzando percentuali diverse di prodotto (1%, 2,5%, 5% v/p) sul peso umido del campione.

Per ogni tipologia di graspo preso in esame (GU I, GU II e GU III) vengono messi in relazione tra loro diversi di tipi di trattamento per verificare le loro sinergie e l'efficacia complessiva di ogni combinazione, ai fini di una destrutturazione chimico-fisica maggiore della biomassa presa in esame. Per tale motivo ogni tipologia di campione viene sottoposto ai trattamenti in tabella 2.13.

Tipologia di trattamento
t. termico
t.termico + t. meccanico
t.termico + t.enzimatico
t.termico + t.meccanico + t.enzimatico

Tabella 2.13 Trattamenti utilizzati per la destrutturazione fisico-chimica dei grasi d'uva presi in esame

Ogni campione su cui viene testato il tipo di trattamento viene mantenuto in agitazione orbitale a pH controllato (50°C e 4,5 pH) per 360 minuti, tempo in cui si raggiunge il plateau di rilascio di zuccheri riducenti in soluzione. A intervalli regolari di tempo vengono prelevate aliquote di reazione per analizzare la quantità di zuccheri riducenti liberati in soluzione durante il trattamento.

Le concentrazioni al tempo 0 (inizio della prova) non sono mai identiche tra i diversi campioni presi in esame a causa della diversa solubilizzazione di zuccheri iniziali dopo il trattamento in autoclave o nella combinazione tra il trattamento termico e meccanico tra una prova e l'altra. Per tale motivo i dati vengono normalizzati attribuendo valore 1 alla concentrazione iniziale di ogni test effettuato per la prova.

Nella figure 2.32, 2.33 e 2.34 viene rappresentato l'andamento della concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione nelle prove effettuate con tre tipologie di grasi d'uva, con diversi trattamenti su tali substrati e con la massima percentuale di Accelerase 1500 utilizzata (5% v/p).

La figura 2.32 relativa ai graspi conservati a 0°C (GU I) evidenzia che i soli trattamenti termici e meccanico non producono alcun rilascio di zuccheri in soluzione durante il tempo di controllo della prova; mentre l'accoppiamento di questi trattamenti con quello enzimatico producono un aumento del rilascio di zuccheri riducenti. Questo risulta coerente con l'ipotesi che i pre-trattamenti termico e meccanico aumentano l'azione d'idrolisi enzimatica nelle matrici lignificate, altrimenti difficilmente accessibili al trattamento.

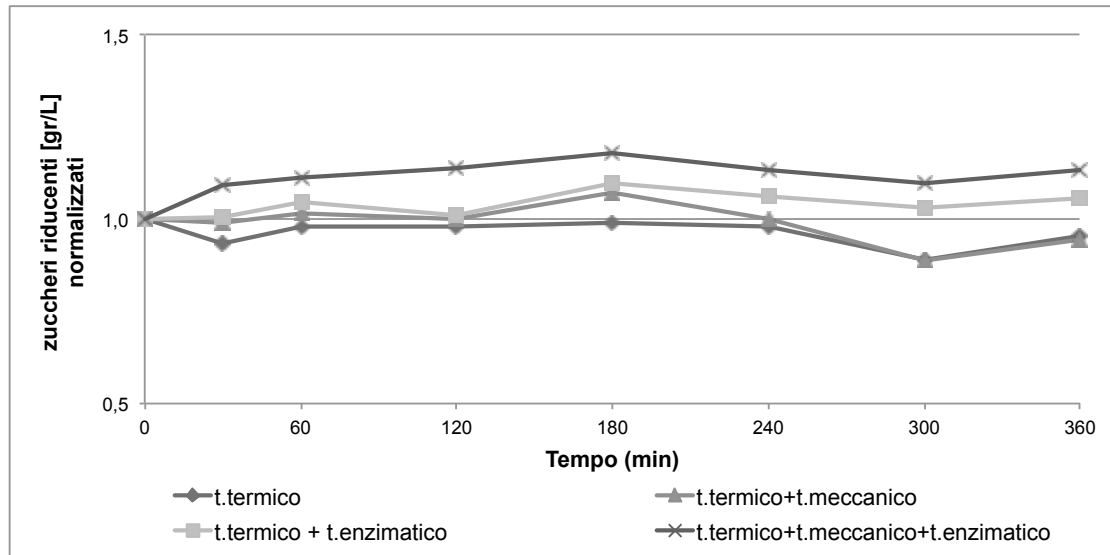


Fig 2.32 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su GU I ad una temperatura di 50°C per 360 minuti (dati normalizzati ad una concentrazione iniziale pari a 1 per ogni test)

Le differenze tra i diversi tipi di trattamento sono ancora più evidenti nella prova effettuate con i graspi d'uva conservati a 4°C (GU II) e 37°C (GU III) come visibile nelle figure 2.33 e 2.34

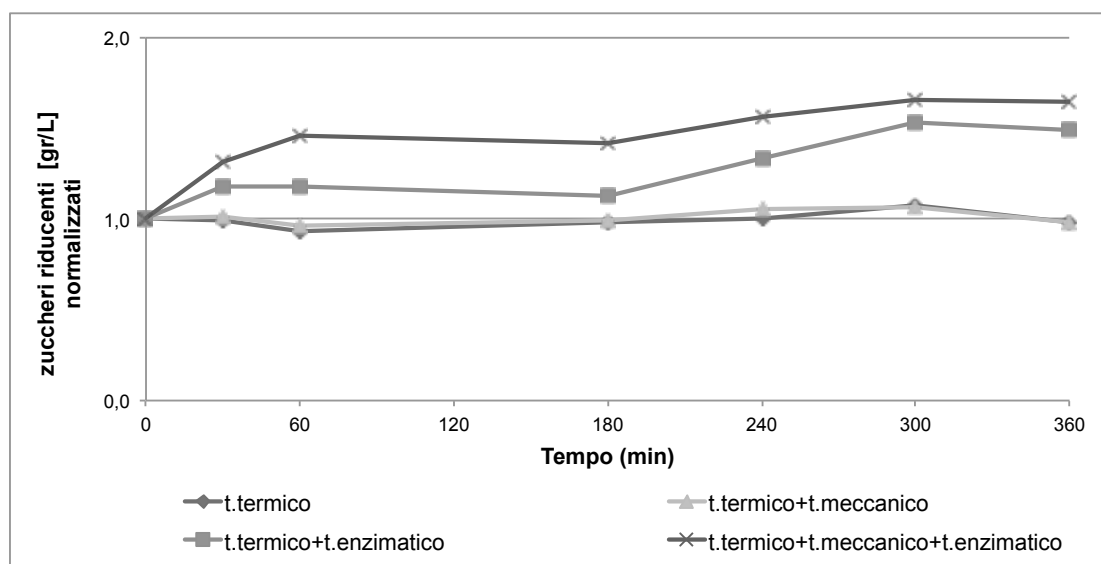


Fig 2.33 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su GU II ad una temperatura di 50°C per 360 minuti (dati normalizzati ad una concentrazione iniziale pari a 1 per ogni test)

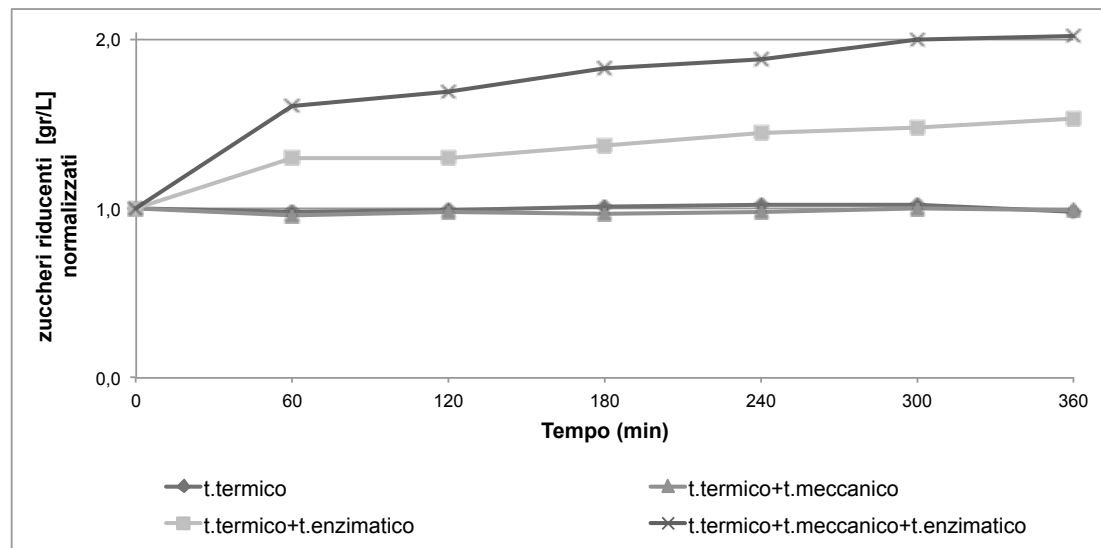


Fig 2.34 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su GU III ad una temperatura di 50°C per 360 minuti (dati normalizzati ad una concentrazione iniziale pari a 1 per ogni test)

Anche con tali tipologie di graspi (GU II e GU III) i soli trattamenti termico e

meccanico non producono alcun rilascio di zuccheri riducenti nel tempo della prova, ma aumentano l'azione idrolitica di Accelerase 1500. La maggiore azione idrolitica del prodotto enzimatico utilizzato su GU II e ancor di più su GU III è spiegabile probabilmente dalle differenti condizioni di conservazione della biomassa. Si può ritenere infatti che l'azione di muffe o microrganismi sviluppati sulla biomassa parzialmente fermentata a temperature più alte, hanno svolto una parziale azione di destrutturazione della matrice cellulare, favorendo e coadiuvando così l'ulteriore azione dello step enzimatico. Ulteriori indagini dovranno essere fatte nella prossima campagna stagionale con la conservazione di grapi sottoposti a sterilizzazione termica preliminare e conservati a diverse temperature al fine di valutare l'effettiva azione della flora microbica autoctona sullo stato di conservazione.

Tali differenze tra tipologia di matrice utilizzata e tipo di trattamento sono visibili anche sulle prove effettuate a percentuali di Accelerase 1500 inferiori (1% e 2,5% v/p) seppure con un incremento di zuccheri riducenti dopo 360 minuti di tenore inferiore, come riassunto in tabella 2.14

Tipo GU	Trattamento	Accelerase 1500 %					
		1%		2,5%		5%	
		differenza zuccheri rid. (gr/ L) (T0-T360 min)	incremento to zuccheri rid. [%] (T0-T360 min)	differenza zuccheri rid. (gr/L) (T0-T360 min)	incremento to zuccheri rid. [%] (T0-T360 min)	differenza zuccheri rid. (gr/L) (T0-T360 min)	incremento to zuccheri rid. [%] (T0-T360 min)
GU I	termico	0,0	0%	0,0	0%	-0,40	-5%
	termico +meccanico	0,0	0%	0,0	0%	-0,5	-6%
	termico +enzimatico	0,1	1%	0,5	7%	0,5	6%
	termico +meccanico +enzimatico	0,4	5%	0,7	11%	1,1	14%
GU II	termico	-0,2	-6%	-0,2	-6%	0,0	0%
	termico +meccanico	-0,1	-3%	-0,2	-6%	-0,1	-4%
	termico +enzimatico	0,4	13%	0,7	22%	1,3	46%

	termico +meccanico +enzimatico	0,7	21%	0,8	24%	1,8	67%
GU III	termico	-0,2	-10%	-0,1	-5%	0,0	0%
	termico +meccanico	-0,2	-9%	-0,2	-9%	0,0	0%
	termico +enzimatico	0,3	13%	0,6	30%	1,0	53%
	termico +meccanico +enzimatico	1,2	57%	1,3	62%	1,9	100%

Tab 2.14 Confronto di efficacia tra diverse tipologie di trattamento su GU I , GU II E GU III, con differenti percentuali di Accelerase 1500 (1, 2,5 e 5% v/p)

Dai dati presenti in tabella 2.14 vengono confermate le valutazioni fatte nelle prove effettuate con alte percentuali di Accelerase 1500, pertanto è possibile stabilire un nesso importante tra i differenti tipi di trattamento e la loro efficacia. I trattamenti di tipo termico e meccanico risultano utili alla destrutturazione della matrice vegetale coadiuvando in maniera importante l'azione enzimatica di cellulasi presenti nel prodotto commerciale utilizzato. L'area superficiale accessibile ad enzimi idrolitici come le cellulasi risulta infatti uno dei fattori più importanti che influenzano l'efficienza idrolitica di substrati lignocellulosici ^{124,125}

Tale azione risulta amplificata su matrici conservate a temperature che consentono lo sviluppo di microrganismi già presenti sulla matrice che la utilizzano come fonte di carbonio per la crescita, producendo enzimi eso-cellulari in grado di degradare la struttura ligno-cellulosica. In tale caso però gli zuccheri presenti nelle diverse matrici risulta essere differente.

Lo sviluppo di microflora batterica e fungina spontanea su graspi d'uva conservati in condizioni di temperatura tali da non bloccare qualsiasi attività microbiologica rende ipotizzabile la produzione di enzimi ligno-cellulosici da parte di tale microflora.

Per tale motivo si richiede la necessità di valutare l'eventuale presenza di tale attività attraverso prove di trattamento utilizzando estratti acquosi di graspi d'uva conservati a 4°C (GU II) e 37°C (GU III) e confrontandone l'efficacia d'idrolisi con Accelerase 1500.

Attraverso un'estrazione in fase acquosa dei GU II e GU III si ipotizza di trasferire in soluzione l'eventuale presenza di enzimi eso-cellulari prodotti dalla microflora

spontanea; pertanto tale estratto viene utilizzato in assenza di pre-trattamenti termici, che inattiverebbero tali enzimi, sulle matrici prese in esame. Occorre confrontare l'effetto enzimatico eventuale della soluzione estratta con Accelerase 1500 attraverso il controllo a tempi definiti degli zuccheri riducenti rilasciati in soluzione durante i 360 minuti previsti per il trattamento. I dati vengono normalizzati attribuendo valore 1 alla concentrazione iniziale di ogni test effettuato per la prova per via della differenza tra le concentrazioni all'inizio di ogni prova (figura 2.35)

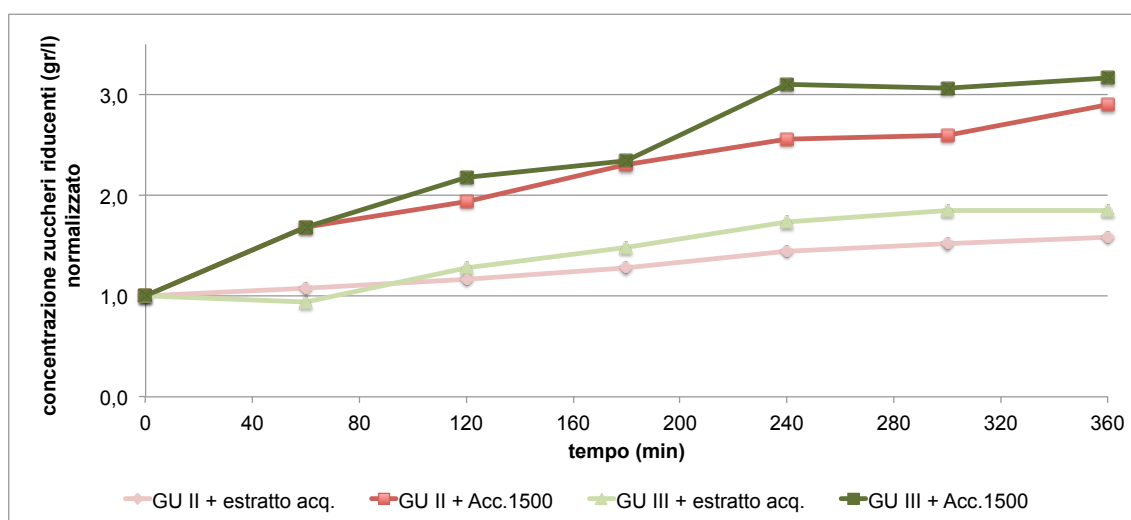


Fig 2.35 Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del diverso tipo di trattamento su GU II e GU III ad una temperatura di 50°C per 360 minuti

Sulle due matrici analizzate vi è un effetto di idrolisi modesto da parte della soluzione acquosa estratta dai grapi d'uva conservati a 4°C e 37°C e ciò risulta in linea con quanto riscontrato nella verifica della combinazione dei diversi trattamenti su grapi d'uva, ovvero che in condizioni di conservazione della biomassa a temperature maggiori l'azione di una microflora spontanea ha parzialmente alterato la struttura ligno-cellulosica della matrice. L'azione idrolitica di Accelerase risulta comunque superiore rispetto all'azione della soluzione acquosa di estrazione.

Coltura in fase sommersa di *Pleurotus ostreatus* e valutazione dell'attività laccasica

L'evidenza sperimentale dell'alterazione della struttura ligno-cellulosica dei grappi d'uva, per effetto di fermentazioni spontanee, mostra la capacità della microflora spontanea sviluppata sul substrato di produrre enzimi cellulari utili alla degradazione di tali substrati. La possibilità di caratterizzare e isolare tali enzimi pone interessanti prospettive sulla possibilità di produrre enzimi direttamente nel sito di utilizzazione delle biomasse evitando l'utilizzo di formulati enzimatici commerciali che possono raggiungere costi elevati e con alta incidenza sull'economia di processo.

A questo scopo viene presa in considerazione la capacità dei white-rot funghi di produrre enzimi utili alla degradazione di biomasse ligno-cellulosiche.

I funghi hanno infatti due pathway di produzione enzimatica extracellulare, in cui il primo sistema idrolitico produce enzimi responsabili della degradazione di polisaccaridi. Gli estratti enzimatici commerciali contenenti enzimi per la degradazione di polisaccaridi come cellulose ed emicellulose sono generalmente ottenuti da funghi e molte sono le cellulasi ed emicellulasi con differenti attività, prodotte da tali organismi. Gli organismi maggiormente studiati per la produzione di emicellulasi e cellulasi commerciali sono *Phanerochaete chrysosporium* tra i basidiomiceti e *Trichoderma reesei*, tra gli ascomiceti¹²⁶. Un secondo sistema di produzione enzimatica extracellulare è invece di tipo ossidativo e degrada la lignina, intervenendo nella struttura fenolica che la costituisce¹²⁷. Nel processo ossidativo di degradazione della lignina da parte fungina gli enzimi chiave del sistema sono polifenolossidasi come lignina perossidasi (EC 1.11.1.14), manganese perossidasi (MnP)(EC 1.11.1.13) e laccasi (EC 1.10.3.2) prodotte da diversi ceppi fungini quali *Botrytis cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stropharia coronilla*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*.^{128,129}

La capacità di questi organismi di produrre enzimi viene valutata come soluzione possibile per un pre-trattamento di tipo biologico¹³⁰ di biomasse ligno-cellulosiche per la produzione di biogas. Tra gli organismi capaci di produrre enzimi eso-cellulari è stato preso in considerazione l'utilizzo di *Pleurotus ostreatus*, un fungo edule appartenente alla famiglia dei basidiomiceti, in grado di produrre enzimi extracellulari come laccasi e manganese perossidasi (MnP)^{131,132}. Tali funghi sono saprofiti e si sviluppano principalmente su tronchi o rami e ceppaie di diverse latifoglie e lo sviluppo dei corpi fruttiferi avviene in autunno e all'inizio dell'inverno. Tale fungo è di grande interesse biotecnologico per la capacità di degradare composti lignocellulosici^{133,134} e per la

capacità di produrre metaboliti secondari per applicazioni farmaceutiche^{135,136} e proteine per uso industriale¹³⁷. La possibilità di produrre enzimi fungini capaci di degradare i composti ligno-cellulosici e l'utilizzo di substrati di crescita a basso costo per la crescita di popolazioni fungine, come gli scarti dell'industria enologica, pone interessanti ipotesi di applicazione su tali sottoprodotti che per tale motivo sono stati valutati e presi in considerazione. La capacità di crescita su substrati ricchi di cellulosa e lignina con un rapporto carbonio/azoto molto alto rende infatti possibile la crescita del micelio su un grande numero di sottoprodotti agricoli, quali paglie di diverse graminacee (grano, segale, riso) e residui della lavorazione di carta e cotone. Viene valutata la capacità di *P.ostreatus* di crescere in colture sommerse cui vengono aggiunte scarti di produzione dell'industria enologica quali graspi e vinaccioli per stimolare la produzione di enzimi eso-cellulari. Tali substrati sono stati valutati in letteratura per la produzione di manganese perossidasi (MnP) e laccasi con colture di *Trametes versicolor*¹³⁸, e la loro aggiunta può inoltre fornire nutrienti necessari alla crescita fungina, riducendo sensibilmente i costi di produzione.

L'attività enzimatica principalmente ricercata nei mezzi di coltura di *P.ostreatus* è stata l'attività della laccasi, che nelle condizioni naturali di crescita del fungo converte i gruppi fenolici liberi della lignina in fenossi radicali che formano chinoni. Viene utilizzato un ceppo di micelio di *P.ostreatus* cresciuto su piastra agarizzata con terreno arricchito a base di estratto di malto e il micelio sviluppatosi viene utilizzato come inoculo per la coltura su fase sommersa con terreno contenente estratto di malto e glucosio. Nel terreno di coltura vengono aggiunti graspi d'uva o vinaccioli per verificare la capacità del substrato immesso di stimolare la produzione di laccasi da parte di *P.ostreatus*.

Durante la fermentazione in fase sommersa viene misurata la concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione con il metodo dell'ADNS come mostrato in figura 2.36 per monitorare il consumo di zuccheri liberi durante il processo fermentativo.

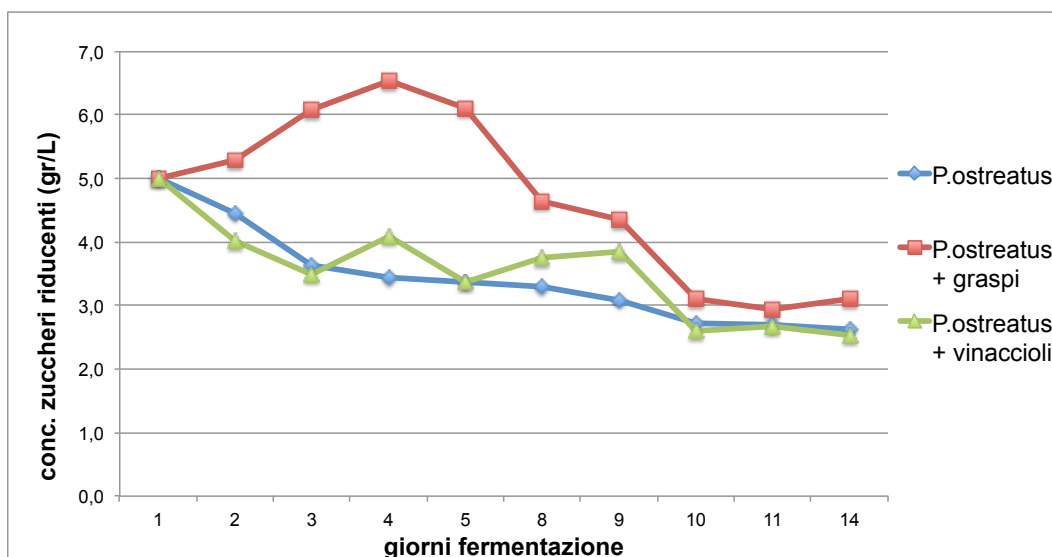


Fig 2.36 Consumo di zuccheri riducenti in funzione del tempo di fermentazione in differenti colture in fase sommersa di *P.ostreatus*

Durante la fermentazione in terreno di coltura con graspi d'uva si assiste nei primi giorni di fermentazione ad un aumento di zuccheri liberi in soluzione dovuto probabilmente alla solubilizzazione di polisaccaridi del graso in soluzione.

Durante il periodo di fermentazione, contestualmente all'andamento di zuccheri riducenti, viene valutata la produzione di laccasi da parte di *P.ostreatus* (figura 2.37) utilizzando il metodo dell'accoppiamento ossidativo tra il 3-metil 2-benzotiazolinone idrazzone (MBTH) e l'orto-metossifenolo (guaiacolo)¹³⁹

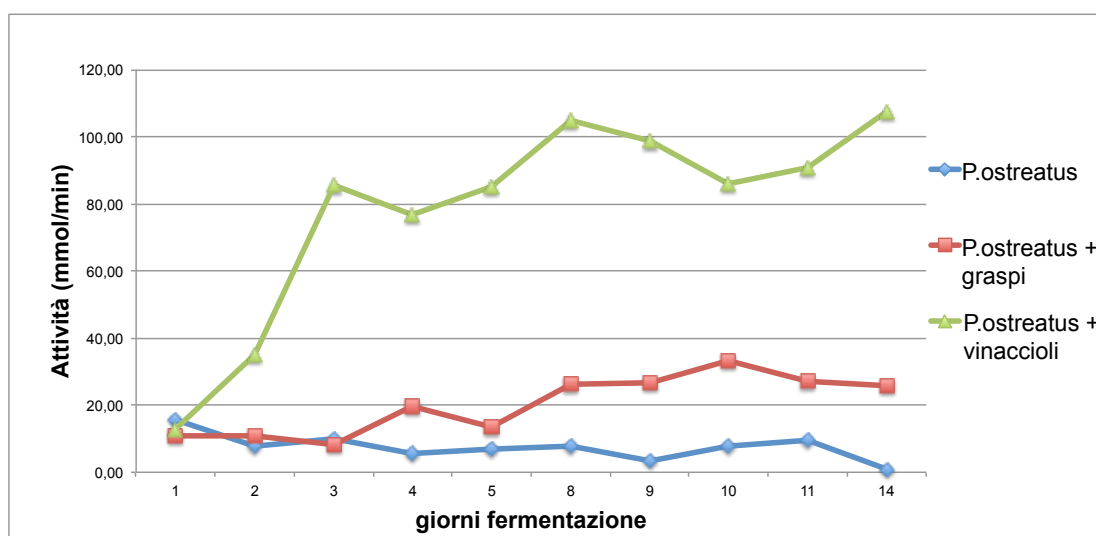


Fig 2.37 Attività laccasica misurata in funzione del tempo di fermentazione in differenti colture in fase sommersa di *P.ostreatus*

La coltura in fase sommersa con l'aggiunta di vinaccioli ha un effetto stimolante sulla produzione di laccasi da parte di *P.ostreatus* molto alto, mentre inferiore risulta l'effetto aggiungendo alla coltura i graspi d'uva, probabilmente per la maggiore disponibilità di zuccheri in fermentazione che abbassa lo stimolo produttivo di laccasi da parte di *P.ostreatus* (tabella 2.15). I vinaccioli infatti contengono una frazione molto significativa di lignina (44% p/p) che induce la produzione di attività laccasica da parte di *P.ostreatus*.^{140,141}

Coltura in fase sommersa	attività laccasica max (mmol/min)
Pleurotus ostreatus	15,78
Pleurotus ostreatus + graspi	33,35
Pleurotus ostreatus + vinaccioli	107,41

Tab 2.15 Attività laccasica ottenuta da coltura in fase sommersa con l'aggiunta di substrati differenti di crescita

Test d'idrolisi enzimatica su residui dell'industria enologica e cerealicola dopo differenti pre-trattamenti

La valutazione di efficacia di vari pre-trattamenti su paglia e graspi d'uva utilizzando Accelerase 1500 è stata confrontata con l'efficacia di altri preparati enzimatici commerciali precedentemente caratterizzati per attività idrolitiche idonee ad idrolizzare strutture polisaccaridiche che compongono i differenti tessuti vegetali di vinacce, paglia e graspi d'uva conservati in condizioni di temperatura tali da non alterare la matrice con fermentazioni spontanee (0°C).

Ogni matrice viene preliminarmente sospesa in acqua con differenti proporzioni a causa del diverso contenuto in umidità tra matrici (vinacce e graspi 1:5, paglia 1:15) e poi sottoposta a trattamento meccanico mediante frullatura e trattamento termico in autoclave a 120°C per 21 minuti. Dopo il trattamento in autoclave ad un'aliquota del campione viene aggiunto il prodotto enzimatico (0,5% p/p) scelto per caratteristiche idrolitiche idonee per il substrato da trattare:

Vinacce: pectinasi + cellulasi

Graspi: cellulasi + amilasi

Paglia: cellulasi + emicellulasi

Ogni step di trattamento viene valutato in termini di zuccheri riducenti e carboidrati totali (metodo fenolo/solforico) liberati.

Test idrolitici su vinacce

I risultati analitici ottenuti su campioni di vinacce in termini di carboidrati totali e zuccheri riducenti liberati dopo ogni step sono rappresentati nelle fig 2.38 e 2.39

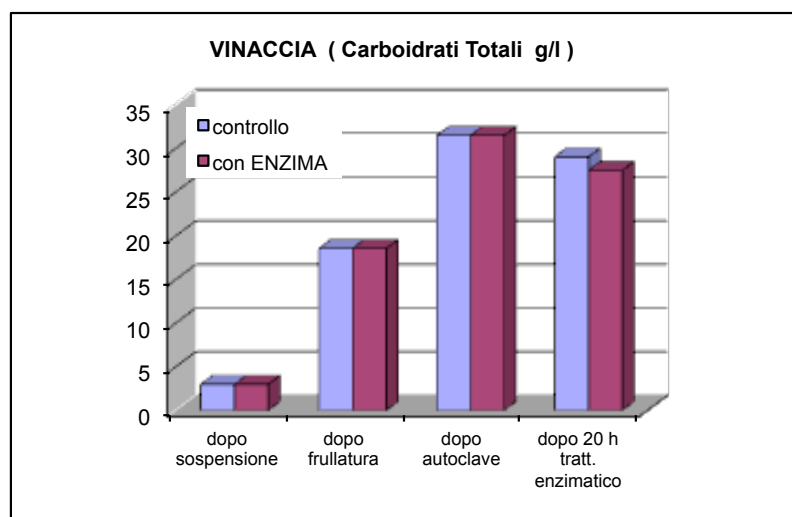


Fig 2.38 Confronto tra concentrazioni di carboidrati totali rilasciati (gr/l) su campioni di vinacce sottoposti a differenti trattamenti

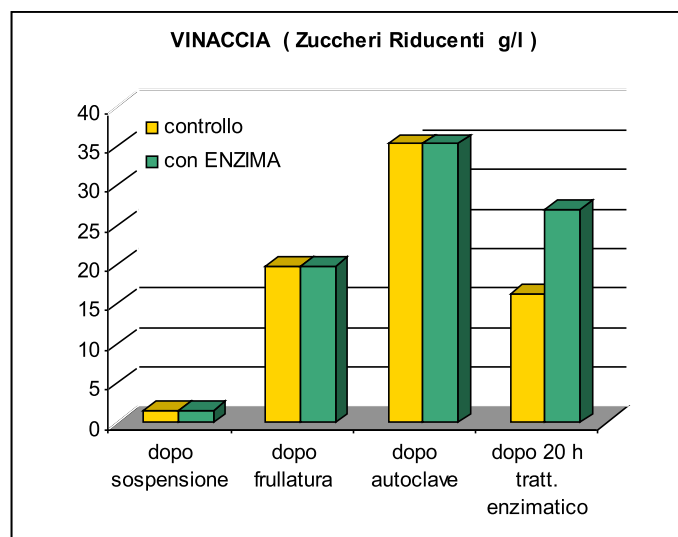


Fig 2.39 Confronto tra concentrazioni di zuccheri riducenti rilasciati (gr/l) su campioni di vinacce sottoposti a differenti trattamenti

Il campione contenente vinaccia mostra un contenuto di zuccheri riducenti e totali molto modesto dopo la sola fase di risospensione in acqua mentre il trattamento di frullatura contribuisce sensibilmente ad incrementare tale valore poichè agisce liberando, ragionevolmente, la frazione di polisaccaridi imprigionata tra le lamelle del tessuto vegetale. L'ulteriore incremento di tali valori a valle del trattamento termico in autoclave potrebbe essere sensibilmente influenzato da fenomeni di concentrazione dovuti alla sottrazione dell'acqua libera da parte delle strutture pectiche che durante tale processo tendono a gelificare coordinando l'acqua stessa.

Il trattamento enzimatico in questo caso non determina differenze importanti in termini di carboidrati totali rispetto al campione di controllo ma tale fenomeno è probabilmente dovuto al fatto che il processo di idrolisi enzimatica libera molta dell'acqua di coordinazione sequestrata dalla frazione polisaccaridica durante il processo termico causando una diluizione degli zuccheri in soluzione.

Gli effetti macroscopici del trattamento enzimatico in termini di fluidità del sistema rispetto al campione non trattato sono visibili in figura 2.40. L'efficacia del trattamento enzimatico in termini di rilascio di zuccheri riducenti è più evidente sebbene tale dato non può essere considerato in termini quantitativi in quanto le problematiche relative agli effetti di diluizione permangono.

I trattamenti effettuati consentono comunque un notevole incremento della frazione fermentescibile del vegetale con risultati massimi in termini di carboidrati totali e riducenti attorno ai 30 g/L con un idrolisi di circa il 9 % in peso della vinaccia trattata.



Fig 2.40 Campione di vinaccia trattato enzimaticamente (sinistra) e del controllo (destra) dopo 20 ore di trattamento enzimatico.

Test idrolitici su graspi d'uva

I risultati analitici ottenuti su campioni di graspi d'uva in termini di carboidrati totali e zuccheri riducenti liberati dopo ogni step sono rappresentati nelle figure 2.41 e 2.42

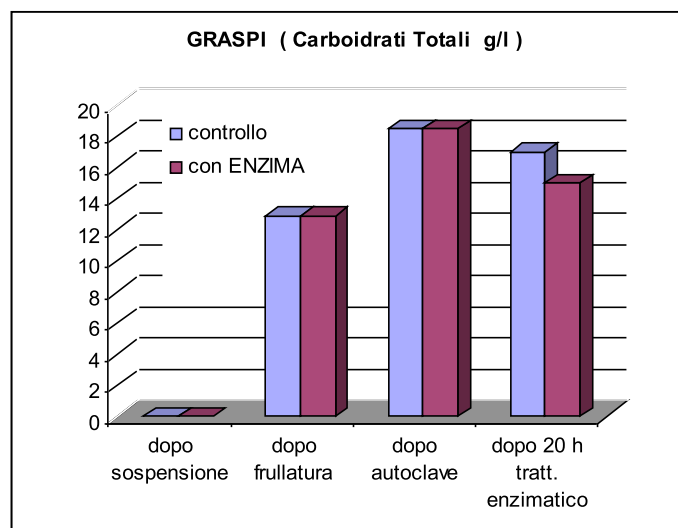


Fig 2.41 Confronto tra concentrazioni di carboidrati totali rilasciati (gr/l) su campioni di graspi sottoposti a differenti trattamenti

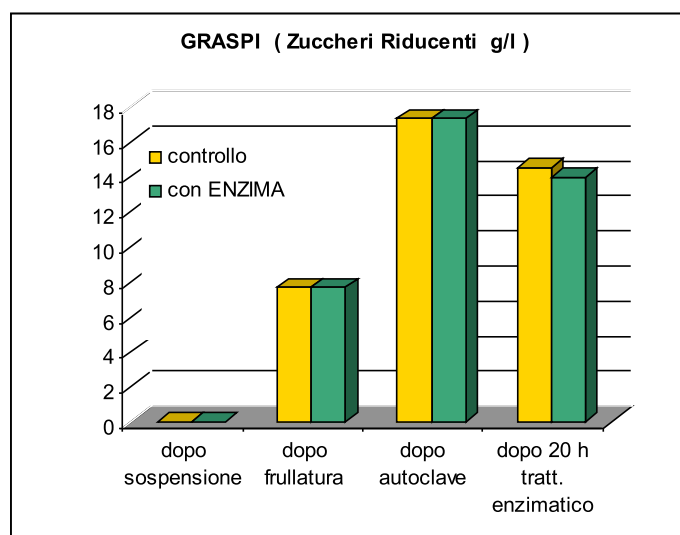


Fig 2.42 Confronto tra concentrazioni di zuccheri riducenti rilasciati (gr/l) su campioni di graspi sottoposti a differenti trattamenti

Il campione di graspi mostra contenuti di saccaridi solubili pressoché nulle (non rilevabili analiticamente) dopo la fase di risospensione in acqua.

A differenza dei test d'idrolisi effettuati con Accelerase 1500 in tale caso l'incremento di zuccheri riducenti appare inferiore e non analizzabile analiticamente. E' ragionevole fare le medesime considerazioni relative alle problematiche riguardanti i fenomeni di coordinazione dell'acqua che comporta concentrazioni e diluizioni degli analiti come per le vinacce.

L'efficacia del trattamento enzimatico difficilmente valutabile per via analitica è però evidente osservando il campione nei test di reazione dopo il trattamento. Come si può osservare in figura 2.43 il campione trattato enzimaticamente è più torbido, indice di una maggiore idrolisi. Anche la frazione solida del campione risulta meno compatta e rigida ad ulteriore conferma dell'effetto che i trattamenti enzimatici hanno su di essa in termini di disaggregazione delle macromolecole strutturali che la compongono.

Il trattamento idrolitico di questa matrice consente la solubilizzazione di circa 18 g/L di zuccheri (riducenti/totali) che in termini di idrolisi di solido corrisponde a circa il 5-6 % in peso della matrice trattata.

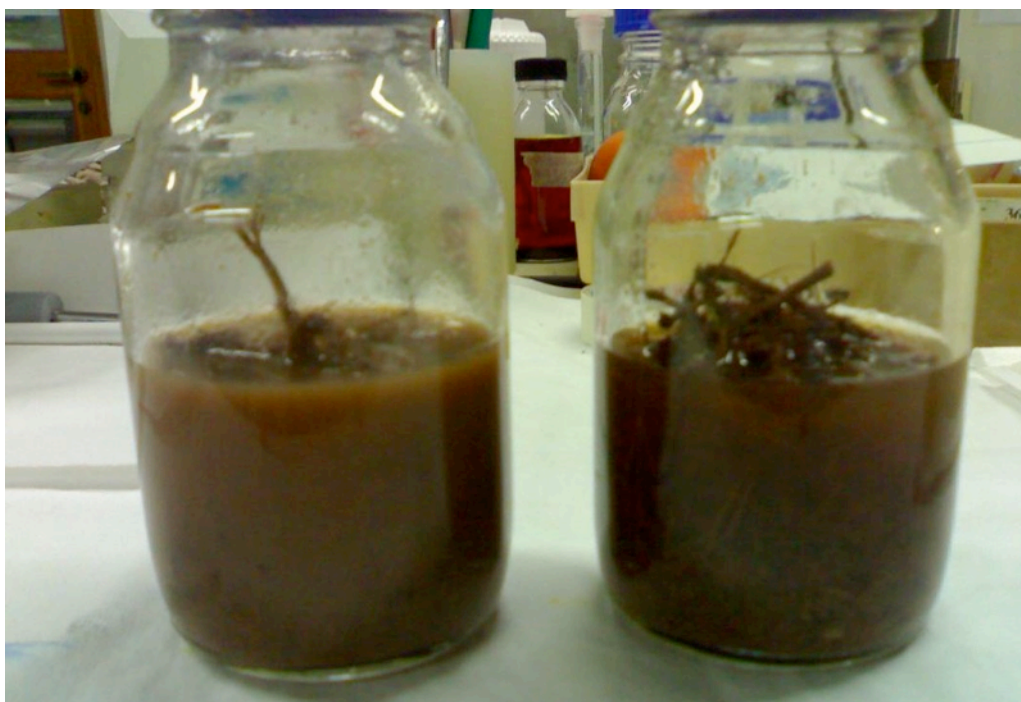


Fig 2.43 Foto del campione di graspi trattato enzimaticamente (sinistra) e del controllo (destra) dopo 20 ore di trattamento enzimatico.

Test idrolitici su paglia

I risultati analitici ottenuti su campioni di paglia in termini di carboidrati totali e zuccheri riducenti liberati dopo ogni step sono rappresentati nelle figure 2.44 e 2.45.

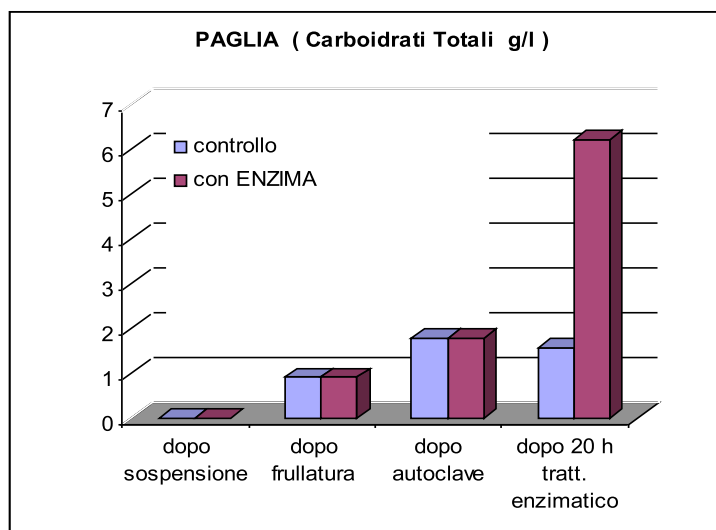


Fig 2.44 Confronto tra concentrazioni di carboidrati totali rilasciati (gr/l) su campioni di paglia sottoposti a differenti trattamenti

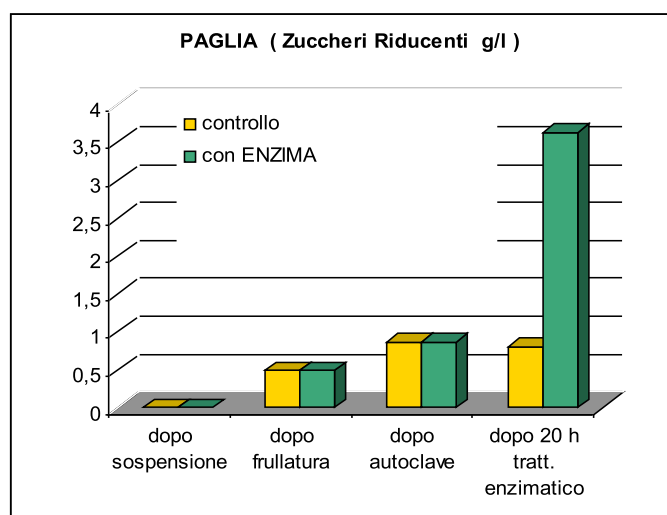


Fig 2.45 Confronto tra concentrazioni di zuccheri riducenti rilasciati (gr/l) su campioni di paglia sottoposti a differenti trattamenti

Per quanto riguarda il campione di paglia, il processo di sospensione in acqua non consente di determinare carboidrati passati in soluzione. Il trattamento meccanico di frullatura e termico in autoclave consentono di solubilizzare solo una piccola frazione di polisaccaridi sia in termini di carboidrati totali che di zuccheri riducenti. Nel caso della paglia i fenomeni di concentrazione/diluizione non sono significativi sia per la diversa composizione strutturale della matrice vegetale sia per il fatto che, essendo risospeso in acqua in proporzione 1:15, il rapporto tra solido e liquido risulta tale da rendere

scarsamente significative le quantità d'acqua coinvolte in fenomeni di gelificazione rispetto alla massa totale del liquido.

Sia in termini di carboidrati totali che in termini di zuccheri riducenti l'effetto di idrolisi dei trattamenti enzimatici su questa matrice risulta molto spiccato confrontandolo con il campione non trattato. Come messo in evidenza nel trattamento su paglia effettuato con Accelerase 1500 appare evidente anche in questo caso che la particolare struttura cellulosa della paglia necessita uno stadio fisico di pre-trattamento che alteri la struttura ligno-cellulosica tipica di questa matrice.

L'effetto idrolitico è visibile anche macroscopicamente nella foto riportata in figura 2.46. Sebbene in termini di zuccheri totali solubilizzati i risultati che si ottengono sono di circa 6 g/L, e quindi molto minori rispetto ai campioni di vinaccia e grapi, tenendo presente che il fattore di risospensione di questa matrice è 5 volte più alto.

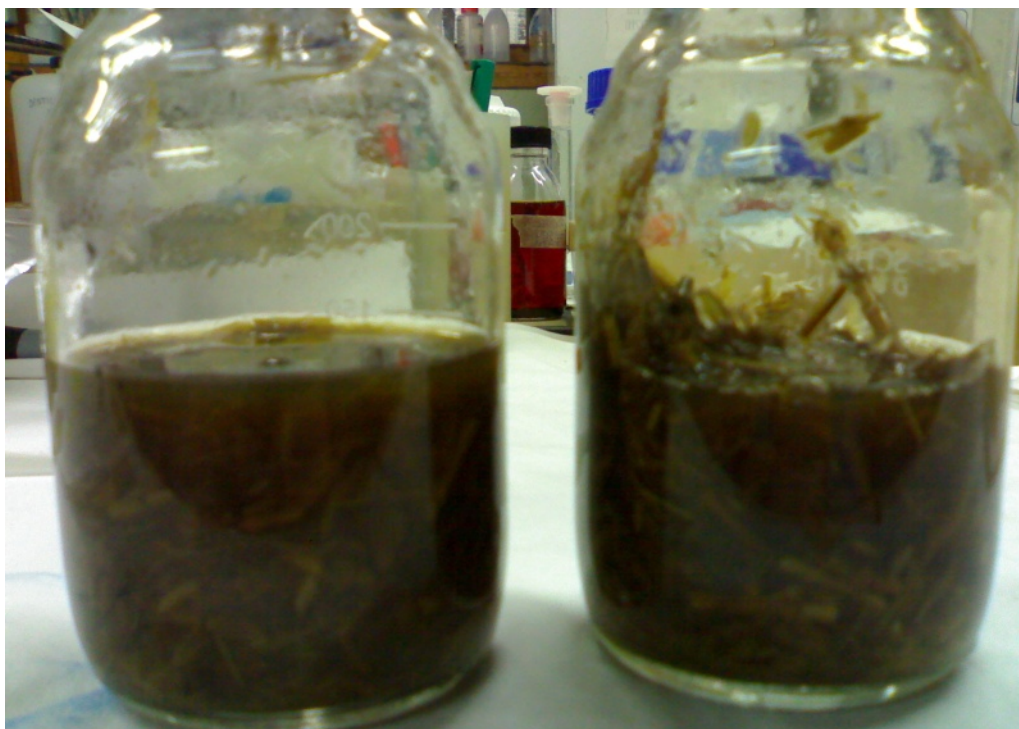


Fig 2.46 Foto del campione di paglia trattato enzimaticamente (sinistra) e del controllo (destra) dopo 20 ore di trattamento enzimatico.

Test di fermentazione su residui dell'industria enologica e cerealicola idrolizzati

L'effetto di ogni pre-trattamento sulle biomasse prese in esame fornisce utili indicazioni sull'efficacia di ogni trattamento nell'idrolisi della struttura ligno-cellulosica esaminata.

Di difficile interpretazione risulta invece comprendere come tale idrolisi abbia effetto e incidenza in un processo di fermentazione anaerobico per la produzione di biogas utilizzando come substrato di fermentazione le biomasse idrolizzate con trattamenti termo-meccanici ed enzimatici.

Si rende pertanto necessario ricorrere a test di fermentazione in batch per verificare l'effetto idrolitico dei pre-trattamenti e del prodotto enzimatico utilizzato in termini di produzione biogas. Ogni test viene effettuato separando la frazione liquida dalla frazione solida di ogni matrice a valle del trattamento pretrattamento termico, meccanico ed enzimatico, al fine di poter valutare la produzione specifica di biogas per ognuna delle due componenti. La produzione di biogas cumulata è stata misurata per 30 giorni di fermentazione al termine della quale viene attribuito ad ogni matrice un valore di produzione biogas specifica in normal/litri di biogas (condizioni standard del gas a 0°C e 1 bar di pressione) per chilo di sostanza secca della matrice considerata.

Fermentazione batch di idrolizzati di vinacce

I test di idrolisi precedentemente condotti su vinacce hanno messo in risalto la capacità del trattamento meccanico e termico di portare in fase liquida una buona quantità di carboidrati totali e zuccheri liberi in soluzione. Analizzando però le produzioni di biogas dalle fermentazioni effettuate sulle diverse frazioni di vinacce idrolizzate, appare evidente che l'idrolizzato liquido non presenta, diversamente da come ci si aspetta, delle buone produzioni in termini di biogas. Analogo risultato si ottiene nel campione di vinaccia che non ha subito alcun tipo di trattamento (tabella 2.16) (figura 2.47)

Produzione specifica di biogas max (Nl/kg s.s.)		
vinacce	idrolizzato di vinacce (solido)	idrolizzato di vinacce (liquido)
80,01	286,15	70,8

Tab 2.16 *Produzione specifica di biogas massima (Nl/kg s.s.) misurata su vinacce idrolizzate e non dopo fermentazione in batch.*

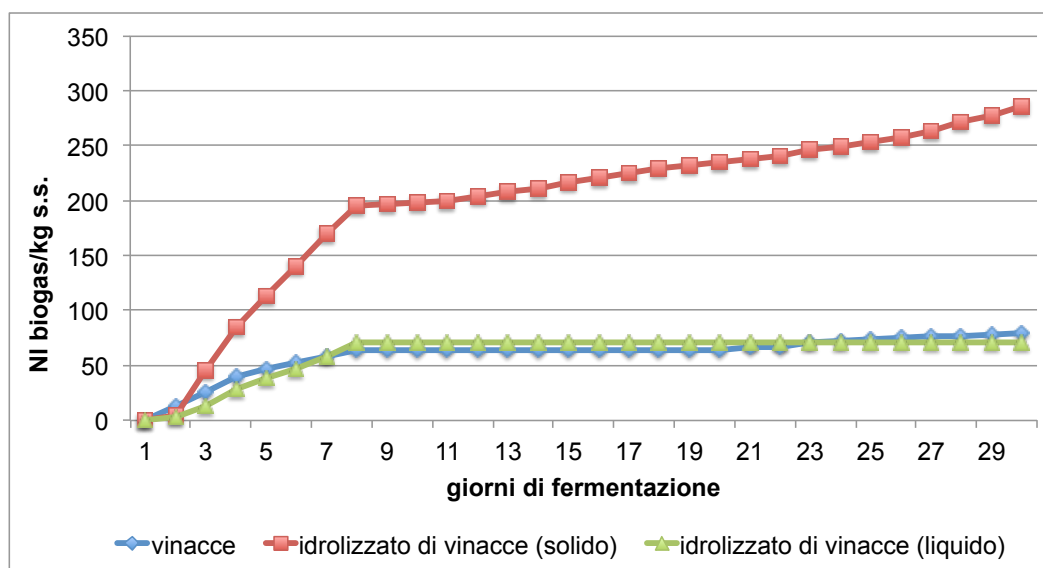


Fig 2.47 Produzione specifica di biogas (NI/kg s.s.) misurata su vinacce idrolizzate e non durante 30 giorni di fermentazione in batch.

Tale risultato sembra essere legato ad un effetto di inibizione fermentativa da parte del solfito utilizzato durante la lavorazione industriale per la produzione del vino¹⁴². Tale considerazione pare supportata dal fatto che l'idrolizzato di vinaccia solida mostra una resa in biogas maggiore rispetto alle altre frazioni, probabilmente perché i solfiti si concentrano prevalentemente nell'acqua durante il trattamento idrolitico rimanendo nell'idrolizzato liquido dove provoca inibizione del processo fermentativo.

Fermentazione batch di idrolizzati di graspi d'uva

Diversamente da quanto messo in evidenza nei campioni idrolizzati di vinacce, l'idrolizzato liquido di graspi mostra produzioni specifiche di biogas molto superiori alle altre frazioni (tabella 2.17) (figura 2.48)

Produzione specifica di biogas max (NI/kg s.s.)		
graspi	idrolizzato di graspi (solido)	idrolizzato di graspi (liquido)
171,49	80,69	532,98

Tab 2.17 Produzione specifica di biogas massima (NI/kg s.s.) misurata su graspi idrolizzati e non dopo fermentazione in batch.

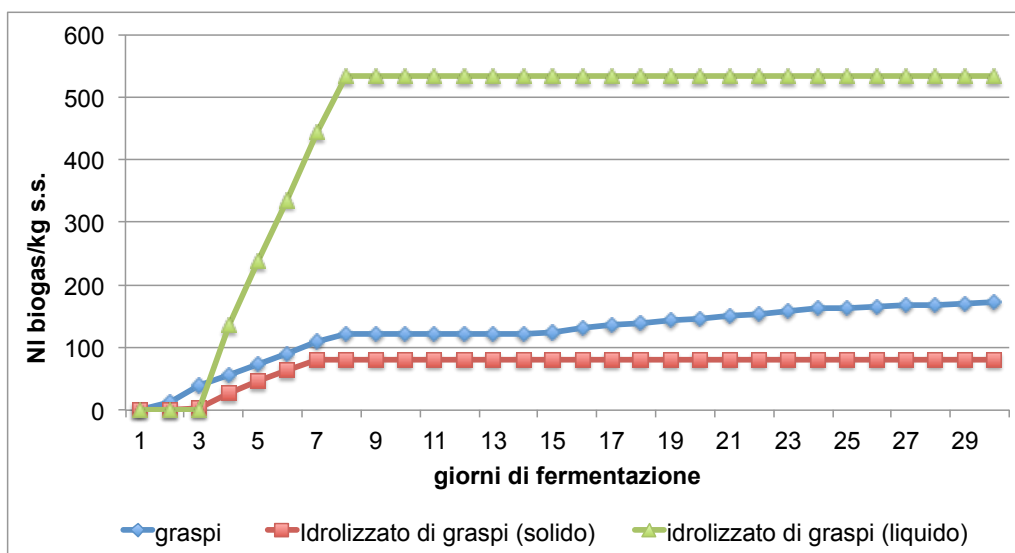


Fig 2.48 Produzione specifica di biogas (NI/kg s.s.) misurata su graspi idrolizzati e non durante 30 giorni di fermentazione in batch.

Dal test fermentativo appare evidente che la maggiore quantità di zuccheri fermentescibili è disponibile nella fase acquosa dopo il trattamento enzimatico, mentre l'idrolizzato solido costituito dal residuo ligno-cellulosico dopo il trattamento enzimatico origina una produzione specifica di biogas nettamente inferiore.

Dal test fermentativo si nota una velocità iniziale di produzione del biogas molto rapida nell'idrolizzato liquido, rispetto all'idrolizzato solido e alla matrice non sottoposta a trattamento. Ciò implica che gli zuccheri derivanti dal pre-trattamento e passati in fase liquida sono velocemente fermentabili.

Fermentazione batch di idrolizzati di paglia

L'importante effetto idrolitico evidenziato dal trattamento enzimatico dopo una destrutturazione fisica e termica del campione di paglia, appare di significativa importanza anche per il test fermentativo su idrolizzati liquidi e solidi di tale matrice com visibile in tabella 2.18 e figura 2.49

Produzione specifica di biogas max (NI/kg s.s.)		
paglia	idrolizzato di paglia (liquido)	idrolizzato di paglia (solido)
389,5	2416,22	658,4

Tab 2.18 *Produzione specifica di biogas massima (Nl/kg s.s.) misurata su paglia idrolizzata e non dopo fermentazione in batch.*

La fermentazione dell'idrolizzato liquido di paglia provoca la formazione di più di 2400 Nl/biogas/kg s.s. a differenza dei 658 Normal litri biogas del solido e particolarmente significativi se confrontati con il campione non sottoposto a trattamento (tab_)

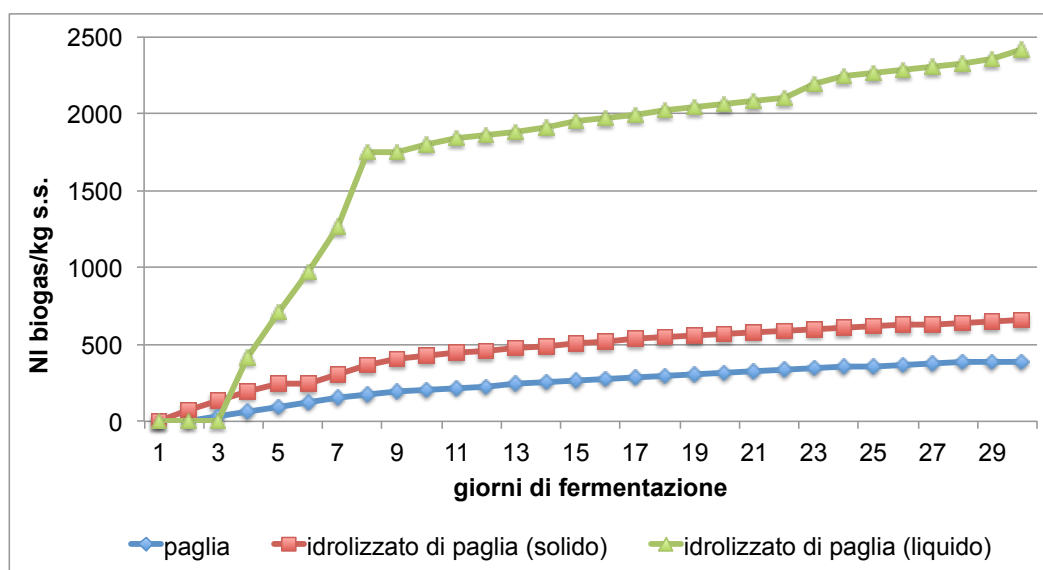


Fig 2.49 *Produzione specifica di biogas (Nl/kg s.s.) misurata su paglia idrolizzata e non durante 30 giorni di fermentazione in batch.*

La curva di produzione biogas dell'idrolizzato liquido mostra una velocità di produzione biogas nettamente superiore rispetto al campione idrolizzato solido e non sottoposto a trattamento. Valgono anche in questo caso le considerazioni fatte per i gaspi d'uva relativamente al passaggio in soluzione di zuccheri rapidamente fermentabili nella fase liquida dell'idrolizzato.

Confronto energetico tra sottoprodotti idrolizzati e matrici comunemente utilizzate per la produzione di biogas

I risultati produttivi ottenuti dai sottoprodotti dell'industria enologica e cerealicola possono essere confrontati con i tipici substrati utilizzati oggi nei processi fermentativi industriali per la produzione di biogas (tabella 2.19).

Substrato	NI/kg s.s.
deiezioni bovine	250
deiezioni suine	450
deiezioni avicole	400
insilato di mais	600
pastone di mais	660
insilato di sorgo	500
insilato di tritcale	505
insilato di frumento	525
insilato di loiessa	480
grassi e oli	700-1000

Tabella 2.19 Produzioni potenziali di biogas medi di alcune biomasse utilizzate nei processi di fermentazione anaerobica

Le produzioni specifiche di biogas ottenute dai test di fermentazione su graspi e vinacce non idrolizzati appaiono di scarso interesse energetico se utilizzate per l'approvvigionamento di impianti industriali per la produzione di metano.

Sui sottoprodotti dell'industria enologica appaiono più interessanti le produzioni dell'idrolizzato liquido di graspi d'uva che ha produzioni assimilabili a quelle di un insilato d'erba, seppure sia molto liquido e comporta volumi molto ampi di fermentazione. La paglia ha una produzione potenziale di biogas più interessante ma l'alto contenuto in lignina del sottoprodotto impone l'utilizzo di pre-trattamenti termomeccanici ed enzimatici che aumentino le produzioni specifiche di biogas.

Conservazione di graspi d'uva in condizioni anossiche

La gestione di sottoprodotti derivanti dal settore agro alimentare pone importanti quesiti in merito alla loro conservazione per periodi tali da consentirne un utilizzo programmabile nel tempo per cui la conservazione di tali biomasse deve prevedere la

creazione di condizioni adatte a limitare i fenomeni degenerativi causati dalla degradazione della sostanza organica in essi contenuti.

La conservazione di grapi d'uva a temperature di 4°C e 37°C permettono lo sviluppo di fermentazioni spontanee in grado di ridurre il contenuto di polisaccaridi presenti nella biomassa determinando una perdita del valore energetico della matrice se utilizzata in fermentazione anaerobica per la produzione di biogas. Occorre pertanto ricorrere a metodiche di conservazione in grado di evitare fermentazioni spontanee non controllabili e indesiderate e consentire una corretta gestione del sottoprodotto limitando il consumo di sostanza organica causato da fermentazioni aerobiche¹⁴³.

La conservazione di biomasse in assenza di ossigeno permette di limitare fortemente il consumo di zuccheri fermentabili e di mantenerne pressoché intatto il valore energetico, per effetto di fenomeni fermentativi ad opera di batteri lattici omofermentanti come *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *L. casei* e batteri lattici eterofermentanti come *L. buchneri*, *L. brevis* e *L. viridescens* che portano alla formazione di acidi, prevalentemente lattico e acetico, che stabilizzano la biomassa conservata attraverso un'acidificazione spontanea che porta il pH a valori compresi tra 3,2 - 4,0.¹⁴⁴

Lo sviluppo di acido acetico aumenta la stabilità della biomassa conservata nel momento in cui questa viene nuovamente a contatto con l'aria per effetto di inibizione sullo sviluppo di funghi, muffe e lieviti che hanno un ruolo chiave nel deterioramento aerobico e nella perdita del valore energetico della biomassa.¹⁴⁵

Si ricorre pertanto alla conservazione di grapi d'uva in condizioni controllate di assenza di ossigeno per un periodo pari a 90 giorni mediante l'aggiunta di un inoculo di *Lactobacillus buchneri* LN 40177 così da garantire la presenza di 200.000 UFC per grammo di prodotto conservato e un rapido abbassamento del pH dei grapi per effetto della capacità del ceppo utilizzato di produrre acido lattico e acido acetico da esosi e pentosi e di degradare acido lattico ad acido acetico in condizioni anossiche.^{146,147,148}

Il *Lactobacillus buchneri* LN 40177 è peraltro caratterizzato per la capacità di produrre ferulato esterasi che, diversamente da cellulasi ed emicellulasi, permette di idrolizzare i legami esterei tra la funzionalità carbossilica di un fenolo acido e una funzionalità idrossile di un carboidrato facente parte delle strutture polisaccaridiche della parete cellulare vegetale, provocando il rilascio di acido ferulico dagli arabinoxilani della parete cellulare vegetale e un incremento della suscettibilità della parete cellulare vegetale all'idrolisi enzimatica.^{149,150} L'acido ferulico forma infatti diverse tipologie di dimeri che consentono di creare strutture a ponte tra due catene polisaccaridiche conferendo alla struttura della parete cellulare vegetale una maggiore stabilità e resistenza meccanica.

L'azione idrolitica della ferulato esterasi può così implementare l'effetto di cellulasi e emicellulasi sulla parete cellulare vegetale e incrementare l'azione idrolitica sulla componente ligno-cellulosica della biomassa trattata.^{151,152,153,154,155} L'azione idrolitica delle esterasi appare di grande rilievo e importanza soprattutto per i grapi d'uva che hanno un contenuto in lignina medio del 20-25% in grado di legare chimicamente molti polisaccaridi fermentescibili utili ai processi di trasformazione biochimica di tali zuccheri in biogas.

Per garantire una maggiore superficie all'azione idrolitica delle ferulato esterasi prodotte da *Lactobacillus buchneri* LN 40177 parte dei grapi è stato trattato meccanicamente e conservato in condizioni di assenza di ossigeno per un periodo pari a 90 giorni.

Quattro tipologie di campione sono state conservate in condizioni anossiche per 90 giorni (tabella 2.20):

Tipologia di trattamento
nessun trattamento
trattamento meccanico
inoculo con <i>Lactobacillus buchneri</i> LN 40177
t.meccanico + inoculo con <i>Lactobacillus buchneri</i> LN 40177

Tab 2.20 Trattamenti utilizzati per la conservazione in condizioni anossiche dei grapi d'uva presi in esame

La conservazione dei campioni in tali condizioni ha permesso di mantenere i campioni apparentemente intatti, senza sviluppo evidente di lieviti o muffe.

Test di fermentazione su grapi d'uva sottoposti a conservazione anossica

La valutazione dello stato di conservazione dei polisaccaridi costitutivi dei grapi d'uva e l'effetto di trattamento meccanico ed idrolitico di esterasi prodotte da *Lactobacillus buchneri* LN 40177 viene effettuata attraverso test di fermentazione in batch.

Per ogni campione analizzato con test di fermentazione anaerobica viene misurata la produzione di biogas cumulata per 26 giorni al termine della quale viene attribuito ad ogni matrice un valore di produzione biogas specifica in Normal/litri di biogas

(condizioni standard del gas a 0°C e 1 bar di pressione) per chilo di sostanza secca della matrice considerata.

Analizzando le produzioni specifiche di biogas per le varie matrici analizzate con test di fermentazione anaerobico si può evidenziare che il solo trattamento meccanico ha effetti diretti di medio rilievo sulla produzione specifica di biogas del campione, così come ha effetti poco rilevanti il trattamento con *Lactobacillus buchneri* LN 40177 su una matrice non destrutturata fisicamente. (tabella 2.16)

Appare invece molto evidente l'effetto del trattamento biologico con *Lactobacillus buchneri* LN 40177 su graspi sottoposti a trattamento meccanico. L'azione meccanica svolta sui graspi per aumentare la superficie disponibile all'azione enzimatica delle esterasi prodotte da *Lactobacillus buchneri* LN 40177 ha difatti consentito un'azione idrolitica molto importante sulla struttura ligno-cellulosica dei graspi.

Tipologia di trattamento	Produzione specifica di biogas max (Nl/kg s.s.)
nessun trattamento	70,3
trattamento meccanico	130,5
inoculo con <i>Lactobacillus buchneri</i> LN 40177	98,8
t.meccanico + inoculo con <i>Lactobacillus buchneri</i> LN 40177	225,5

Tab 2.21 Produzione specifica di biogas (Nl/kg s.s.) misurata dopo 26 giorni di fermentazione su graspi sottoposti a diversi trattamenti dopo 90 giorni di conservazione in condizioni anossiche.

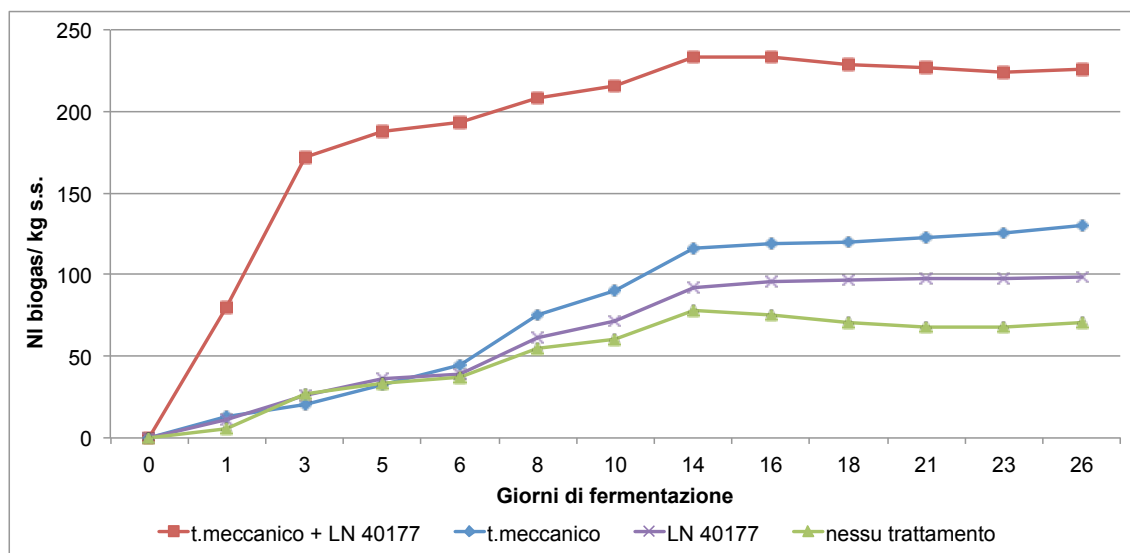


Figura 2.50 Produzione specifica di biogas (NI/kg s.s.) misurata dopo 26 giorni di fermentazione su graspi sottoposti a diversi trattamenti dopo 90 giorni di conservazione in condizioni anossiche.

La capacità del *Lactobacillus buchneri* LN 40177 di produrre enzimi esocellulari in grado di degradare la struttura ligno-cellulosica dei graspi d'uva viene confermata dai test di fermentazione effettuati, pertanto è ipotizzabile l'utilizzo di tale soluzione tecnologica per la conservazione di matrici vegetali con un alto contenuto di lignina per preservarne le caratteristiche bromatologiche ed aumentare la loro produttività in biogas se utilizzate in fermentazioni anaerobiche per la produzione di biogas.

3. CONCLUSIONI

La ricerca è stata incentrata sulla valorizzazione energetica degli scarti agro-alimentari dell'industria enologica e cerealicola mediante una destrutturazione preliminare delle matrici vegetali con tecniche d'idrolisi meccanica ed enzimatica. Sono state oggetto di studio le risorse derivanti dai processi produttivi di tali filiere e utilizzabili per una valorizzazione energetica in fermentazione anaerobica per la produzione di biogas ovvero vinacce, graspi e vinaccioli per l'industria enologica e paglia per l'industria cerealicola.

Per le prove sperimentali riguardanti l'idrolisi enzimatica sono stati caratterizzati preparati enzimatici prodotti da: Novozymes e Genencor. Lo screening di attività enzimatica su tali prodotti è stato effettuato valutando le loro potenzialità sia come agenti destrutturanti per la matrice vegetale sia per la capacità di idrolizzare specificamente i polisaccaridi che costituiscono la struttura ligno-cellulosica delle biomasse prese in esame. E' stato osservato che talvolta le attività preponderanti che caratterizzano un preparato non sono in realtà quelle per le quali il preparato stesso viene commercializzato. Da ciò deriva la necessità di caratterizzare accuratamente i biocatalizzatori da impiegare per finalità specifiche indipendentemente da quanto riportato nelle schede tecniche del produttore e dunque di sviluppare metodologie analitiche ad hoc.

Lo screening relativo ai prodotti enzimatici Novozymes ha messo in evidenza buone capacità idrolitiche del prodotto NS-50012 sui substrati amido, xilano e pectina, seppure sia poco efficiente nella destrutturazione fisica dei fogli di cellulosa utilizzati per la misura visiva dell'attività cellulasica. L'attività cellulasica di tale prodotto appare comunque elevata per effetto dell'attività eso-cellulasica di idrolisi sui monomeri terminali delle catene polisaccaridiche di cellulosa che non determina però una liquefazione totale del substrato utilizzato. L'unico prodotto utilizzato nello screening ad avere un effetto sull'idrolisi fisica del foglio di cellulosa è stato l'NS-50013.

Lo screening di attività enzimatica sui prodotti enzimatici Genencor è stato effettuato con metodiche analoghe a quelle utilizzate per l'analisi di attività enzimatica dei prodotti Novozymes. Sono stati presi in esame un prodotto commercializzato da Genencor come base per i trattamenti enzimatici su biomasse ligno-cellulosiche, Accelerase 1500, e i prodotti accessori che coadiuvano le attività idrolitiche di Accelerase 1500.

Tutti i prodotti accessori (XY, XC e BG) hanno attività idrolitiche su amido, xilano e pectina superiori a quelle di Accelerase 1500 ma non hanno effetti diretti sulla

destrutturazione fisica del foglio di cellulosa utilizzato le prove di attività cellulase; diversamente da Accelerase 1500 che provoca una liquefazione di tale substrato.

I prodotti enzimatici XY, XC e BG al momento non sono disponibili in commercio per cui in un'ottica di scale up-industriale del trattamento enzimatico sulle biomasse prese in esame si è reso necessario procedere alla caratterizzazione enzimatica del prodotto Accelerase 1500. L'attività di screening è stata concentrata su tale prodotto che è già presente sul mercato.

L'attività di rilascio di zuccheri riducenti di Accelerase 1500 appare migliore a temperature superiori a quelle utilizzate per il primo screening a 40°C, per cui è stata individuata la temperatura di 50°C come ottimale per l'attività enzimatica del prodotto, anche in relazione alla maggiore stabilità nel tempo a tali temperature.

L'indagine relativa alla destrutturazione fisica di biomasse con alto contenuto in lignina è stata eseguita mediante trattamento termico in autoclave, e trattamenti meccanici con una frullatura per l'omogeneizzazione dei campioni e un processo di estrusione meccanica. Le prove sperimentali su paglia hanno permesso di stabilire un nesso importante tra l'aumento di superficie della biomassa trattata con trattamento meccanico e l'azione idrolitica del prodotto enzimatico utilizzato. Il trattamento meccanico infatti determina un'azione migliore di rilascio di zuccheri riducenti a partire da percentuali di Accelerase 1500 pari a 0,1% e fino al 5%, concentrazione massima testata, con discreta proporzionalità all'aumentare della percentuale di enzima utilizzato.

Tale conferma si è avuta nel trattamento termo-meccanico ed idrolitico realizzato su grapi d'uva con risultati differenti rispetto alle diverse combinazioni di trattamenti utilizzati per le prove sperimentali e in relazione alla diversa tipologia di substrato utilizzato. Anche nei test sui grapi il trattamento termico e meccanico hanno consentito una migliore azione idrolitica di Accelerase 1500 con performance molto maggiori su grapi d'uva conservati a temperature di 4°C (GU II) e 37°C (GU III). A tali temperature seppure sia stato verificato un consumo importante di zuccheri fermentescibili sul materiale, dovuto allo sviluppo di fermentazioni spontanee, è stata verificata una maggiore azione idrolitica per prodotto enzimatico utilizzato. Probabilmente lo sviluppo di microflora batterica e fungina spontanea su grapi d'uva conservati in condizioni di temperatura tali da non bloccare qualsiasi attività microbiologica rende ipotizzabile la produzione di enzimi ligno-cellulosici da parte di tale microflora. La conferma di tale ipotesi si è avuta mediante trattamento dei grapi d'uva attraverso un'estrazione in fase acquosa dei GUII e GUIII, ipotizzando di trasferire in soluzione l'eventuale presenza di enzimi eso-cellulari prodotti dalla

microflora spontanea, e utilizzando tale soluzione per il successivo trattamento di altre aliquote di graspi.

L'evidenza sperimentale del deterioramento dei graspi d'uva conservati in condizioni tali da non bloccare processi fermentativi indesiderati ha messo in evidenza la capacità della microflora spontanea sviluppata sul substrato di produrre enzimi eso-cellulari utili alla degradazione di tali substrati.

Sulla base di tali evidenze sperimentali è stata indagata la capacità di *Pleurotus ostreatus* di produrre enzimi utili alla degradazione di biomasse ligno-cellulosiche. Le prove di crescita del micelio di *Pleurotus ostreatus* hanno così messo in evidenza la capacità del fungo di crescere su terreno liquido aggiunto di substrati ligno-cellulosici come i graspi d'uva e i vinaccioli e di produrre la maggiore quantità di laccasi soprattutto su quest'ultimo substrato, contenente una frazione molto significativa di lignina (44% p/p).

Sono state condotte poi ulteriori indagini relativamente ai trattamenti termo-meccanici ed enzimatici su paglia e su graspi d'uva e vinacce con enzimi idrolitici scelti per caratteristiche idrolitiche idonee al substrato da trattare in concentrazione 0,5% p/p del solido trattato.

I test idrolitici condotti su vinacce e graspi hanno mostrato una forte incidenza sul rilascio di zuccheri riducenti e carboidrati totali dopo i trattamenti meccanici di frullatura e termici di trattamento in autoclave, mentre i risultati con trattamenti enzimatici sono più visibili dalle differenti caratteristiche macroscopiche tra il campione trattato enzimaticamente e non trattato. L'analisi di carboidrati totali e zuccheri riducenti dopo il trattamento enzimatico su vinacce non evidenzia un'ulteriore rilascio di polisaccaridi dopo il trattamento enzimatico, probabilmente perchè il processo di idrolisi enzimatica libera molta dell'acqua di coordinazione sequestrata dalla frazione polisaccaridica durante il processo termico causando una diluizione dei polisaccaridi stessi in soluzione.

Nel test idrolitico sulla paglia invece appaiono molto evidenti gli effetti del trattamento idrolitico dopo 20 ore, soprattutto perchè i fenomeni di concentrazione e diluizione sono ridotti per effetto della composizione strutturale della matrice.

Risultano ben più apprezzabili le differenze tra i substrati non trattati e gli idrolizzati liquidi e solidi analizzati con test di fermentazione anaerobica in batch per misurare la produzione di biogas da ogni substrato utilizzato nelle prove sperimentali. Dai test fermentativi su vinacce appare probabile l'effetto di solfiti sull'inibizione della flora batterica utilizzata come inoculo microbiologico per l'esecuzione dei test fermentativi. L'idrolizzato solido di vinacce invece ha una produzione di biogas superiore per effetto

di una minore concentrazione di solfiti.

I test fermentativi su graspi d'uva e paglia rendono invece evidente l'effetto idrolitico dei trattamenti termo-meccanici ed enzimatici e la maggiore concentrazione di zuccheri fermentabili nelle frazioni liquide di idrolizzati per effetto dei diversi trattamenti. Gli idrolizzati liquidi e i campioni non sottoposti a trattamento hanno invece produzioni di biogas inferiori.

Le prove sperimentali sui graspi d'uva condotte in condizioni di fermentazione controllata mediante l'utilizzo di un inoculo microbiologico di *Lactobacillus buchneri* LN 40177 hanno permesso di individuare condizioni idonee per la conservazione e utilizzo di tali sottoprodotti, evitando lo sviluppo di fermentazioni aerobiche che deperiscono molto rapidamente il sottoprodotto. La conservazione in condizioni anossiche ha quindi permesso la conservazione dei graspi per 12 settimane mantenendo ottime le condizioni dei graspi così conservati, poichè non sono stati evidenziati fenomeni macroscopici di deterioramento del prodotto. I test di fermentazione condotti sui graspi trattati meccanicamente e con *Lactobacillus buchneri* LN 40177 hanno messo in risalto un effetto molto importante di ferulato esterasi prodotte dal batterio nella degradazione dei legami tra l'acido ferulico e i polisaccaridi della parte cellulare vegetale determinando una maggiore degradabilità di tali polisaccaridi nei processi fermentativi per la produzione di biogas.

Andrà compreso come l'effetto prodotto da ferulato esterasi prodotte da *Lactobacillus buchneri* LN 40177 possa ulteriormente aumentare le performance d'idrolisi enzimatica di prodotti enzimatici commerciali a monte di una fermentazione anaerobica per la produzione di biogas. Appare probabile che l'azione di ferulato esterasi possa implementare l'effetto di cellulasi ed emicellulasi sulla parete cellulare vegetale e incrementare l'azione idrolitica sulla componente ligno-cellulosica della biomassa trattata.

Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove preliminari di destrutturazione catalitica delle biomasse derivanti dai processi produttivi dei cereali e del vino è possibile ipotizzare uno scale up del processo di lisi termo-meccanica della biomassa ligno-cellulosica e di idrolisi enzimatica degli scarti agro-industriali presi in esame, attraverso lo sviluppo di un pre-trattamento termico-meccanico ed enzimatico sequenziale a monte di un impianto di produzione di biogas. Il processo rappresenterebbe l'introduzione di una tecnologia innovativa, non ancora attuata in Italia in impianti di produzione di biogas, e che potrebbe configurarsi come uno stadio analogo al pre-trattamento enzimatico della biomassa ligno-cellulosica che comunemente avviene oggi nella produzione di bioetanolo.

4. MATERIALI E METODI

Pre-trattamenti su scarti ligno-cellulosici

Screening e caratterizzazione di prodotti enzimatici commerciali

Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo di Baley)¹⁰³

La procedura di determinazione dell'attività enzimatica si basa sul metodo di Bailey, il quale consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS).^{*} Il saggio permette la determinazione del monomero di zucchero liberato durante l'idrolisi enzimatica per via della reazione tra il reattivo DNSA e lo zucchero come descritto in figura 3.1

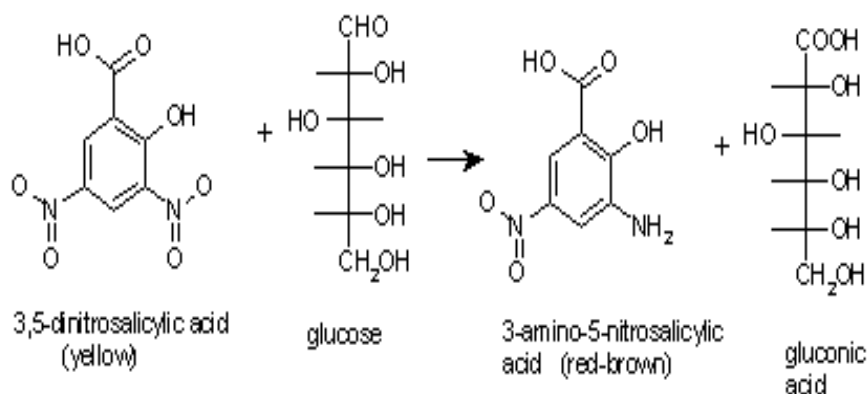


Fig 3.1 Reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso).

Il metodo per la determinazione degli zuccheri riducenti permette di determinare spettrofotometricamente la quantità di prodotto liberato nell'unità di tempo. Lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è il D(+)-glucosio. La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio ($C_6H_{12}O_6$ P.M. 180,16 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 1 g/l in H_2O . A 400 μ l di tali soluzioni si aggiungono 600 μ l di ADNS.

1

¹ * 75g di sodio potassio tartrato vengono sciolti in 50 ml di NaOH 2M, portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido Dinitrosalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H_2O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

I campioni così preparati sono tenuti in acqua bollente per 7 minuti, centrifugati e l'assorbanza è letta a 550 nm contro un campione a concentrazione di zucchero nulla (bianco).

La concentrazione di zuccheri riducenti espressa in g/l di glucosio si ottiene usando la retta di taratura riportata in figura 3.2

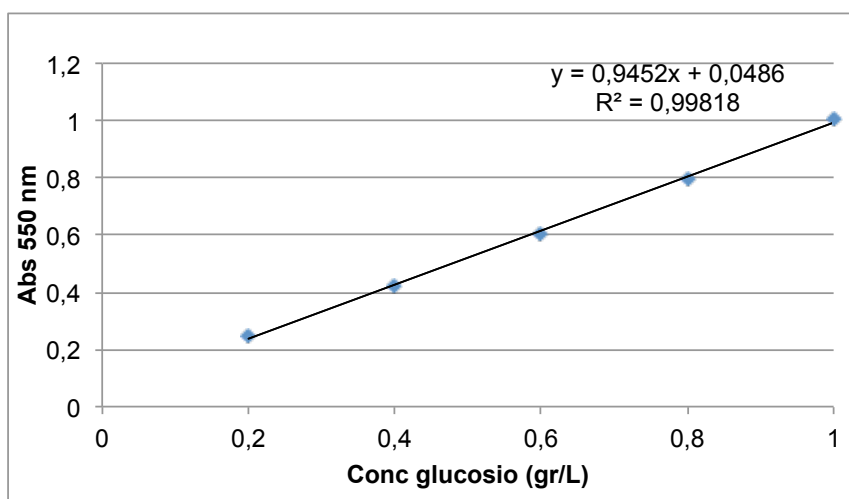


Fig 3.2 Retta di taratura per la determinazione degli zuccheri riducenti nel saggio enzimatico utilizzato per la caratterizzazione dei prodotti enzimatici commerciali

Attività amilasica

La procedura per determinare l'attività amilasica si basa sul metodo descritto precedentemente rilevando il rilascio degli zuccheri riducenti dovuto al trattamento enzimatico in una soluzione standard di amido monitorato tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio ($C_6H_{12}O_6$ P.M. 180,16 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 1 g/l in H_2O

Per la determinazione dell'attività amilasica dei prodotti utilizzati nello screening vengono preparate delle soluzioni all' 1% di amido (p/v) (from wheat, Fluka) in tampone Mc Ilvaine a pH 5, facendo solubilizzare il polimero mantenendo le soluzioni a circa 80 °C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima. Il saggio viene effettuato utilizzando 1,8 ml di substrato a cui vengono aggiunti 0,2 ml di soluzione enzimatica e incubando il campione a 37 °C in agitazione per 3 minuti. Al termine dei 3 minuti vengono prelevati 0,4 ml dal batch di reazione e

viene bloccata l'attività enzimatica mediante l'aggiunta di 0,6 ml di DNSA. Successivamente viene eseguita la determinazione degli zuccheri riducenti con la metodica di Bailey. La lettura spettrofotometrica viene fatta contro un bianco preparato analogamente al batch di reazione, aggiungendo però a 1,8 ml di substrato 0,2 ml di H₂O distillata. Le concentrazioni di glucosio in campioni incogniti si ottengono usando la retta di taratura in figura 3.2

Attività xilanasica

La procedura per determinare l'attività xilanasica si basa sul metodo descritto precedentemente, rilevando il rilascio degli zuccheri riducenti in seguito al trattamento enzimatico in una soluzione standard di xilano monitorato tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). Per la determinazione dell'attività xilanasica lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è lo xilosio. La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-xilosio (C₅H₁₀O₅ P.M. 150,13 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 1 g/l in H₂O. La concentrazione di xilano liberato si ottiene tramite una retta di taratura effettuata su una soluzione di xilosio a diverse concentrazioni come riportato in figura 3.3

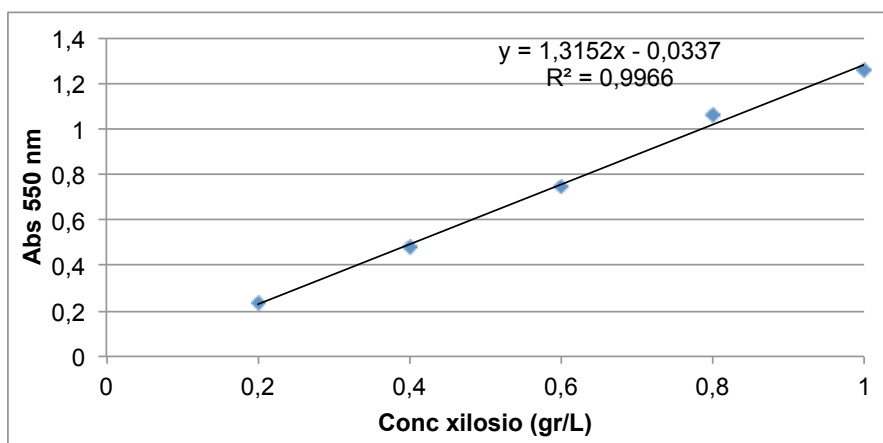


Fig 3.3 Retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasica nel saggio enzimatico utilizzato per la caratterizzazione dei prodotti enzimatici commerciali

Analogamente a quanto descritto per la preparazione del substrato di amido viene utilizzata una soluzione all' 1% di xilano di betulla (p/v) (from Bichwood, Fluka) per la

preparazione del substrato di xilano in tampone Mc Ilvaine a pH 5, facendo solubilizzare il polimero mantenendo le soluzioni a circa 80 °C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima. Il saggio viene effettuato utilizzando 1,8 ml di substrato a cui vengono aggiunti 0,2 ml di soluzione enzimatica e incubando il campione a 37 °C in agitazione per 3 minuti. Al termine dei 3 minuti vengono prelevati 0,4 ml dal batch di reazione e viene bloccata l'attività enzimatica mediante l'aggiunta di 0,6 ml di DNSA. Successivamente viene eseguita la determinazione degli zuccheri riducenti con la metodica di Bailey. La lettura spettrofotometrica viene fatta contro un bianco preparato analogamente al batch di reazione, aggiungendo però a 1,8 ml di substrato 0,2 ml di H₂O distillata. Le concentrazioni di xilosio in campioni incogniti si ottengono usando la retta di taratura in fig 3.3

Attività pectinasica

La procedura per determinare l'attività pectinasica si basa sul metodo descritto precedentemente rilevando il rilascio degli zuccheri riducenti dovuto al trattamento enzimatico in una soluzione standard di pectina monitorato tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). Per la determinazione dell'attività pectinasica lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è l'acido-galatturonico. La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di acido D(+)-galatturonico monoidrato (C₆H₁₀O₇ * H₂O P.M. 212,2 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 1 g/l in H₂O. La concentrazione di acido galatturonico liberato si ottiene tramite una retta di taratura effettuata su una soluzione di acido α-D-galatturonico a diverse concentrazioni come riportato in figura 3.4

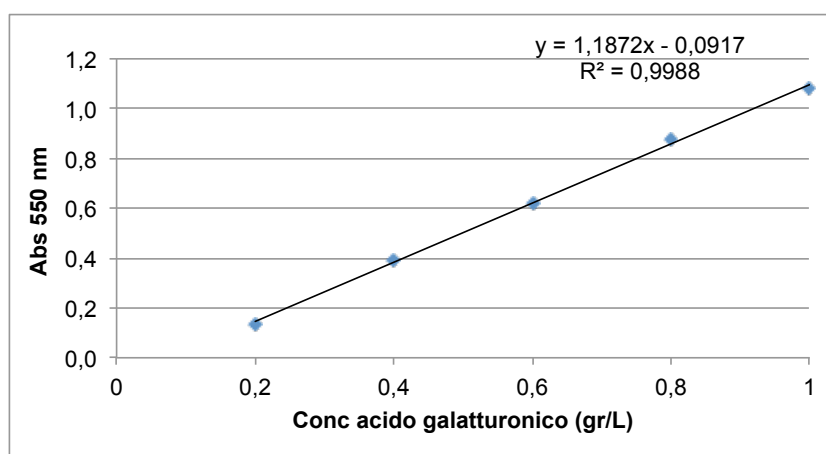


Fig 3.4 Retta di taratura per la determinazione dell'attività pectinasica nel saggio enzimatico utilizzato per la caratterizzazione dei prodotti enzimatici commerciali

Analogamente a quanto descritto per la preparazione del substrato di amido viene utilizzata una soluzione allo 0,3% di pectina di mela (p/v) (from Apples, Fluka) per la preparazione del substrato di pectina, in tampone Mc Ilvaine a pH 5, facendo solubilizzare il polimero mantenendo le soluzioni a circa 80 °C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima. Il saggio viene effettuato utilizzando 1,8 ml di substrato a cui vengono aggiunti 0,2 ml di soluzione enzimatica e incubando il campione a 37 °C in agitazione per 3 minuti. Al termine dei 3 minuti vengono prelevati 0,4 ml dal batch di reazione e viene bloccata l'attività enzimatica mediante l'aggiunta di 0,6 ml di DNSA. Successivamente viene eseguita la determinazione degli zuccheri riducenti con la metodica di Bailey. La lettura spettrofotometrica viene fatta contro un bianco preparato analogamente al batch di reazione, aggiungendo però a 1,8 ml di substrato 0,2 ml di H₂O distillata. Le concentrazioni di acido galatturonico in campioni incogniti si ottengono usando la retta di taratura in fig 3.4

Attività cellulasica

Per determinare l'attività cellulasica una quantità di carta pari a 0,1 gr viene sospesa in 5 ml di tampone McIlvine (pH 5) e 50 µl di enzima. Dopo 18 ore di idrolisi enzimatica viene valutato lo stato fisico del foglio di carta e la quantità di glucosio eventualmente liberata in soluzione. La procedura per determinare l'attività cellulasica si basa sul metodo descritto precedentemente rilevando il rilascio degli zuccheri riducenti dovuto al trattamento enzimatico del foglio di cellulosa monitorato tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). Le concentrazioni di glucosio in campioni incogniti si ottengono usando la retta di taratura in fig 3.2

Determinazione dell'attività xilanasica del preparati enzimatico Accelerase 1500 a diverse temperature

Sono state preparate soluzioni di amido all'1% (p/v), xilano allo 1% (p/v) e pectina allo 0,3% (p/V) in tampone Mc Ilvine a pH 5,0 come descritto in precedenza. Le soluzioni

sono state poste a bagnomaria per portare ciascuna soluzione alla temperatura desiderata e mantenerla costante nel corso della prova; si è scelto di monitorare l'andamento dell'attività xilanasica alle temperature di 50 e 60 °C. Dopo aver raggiunto la temperatura desiderata, alla soluzione di amido, xilano e pectina sono stati aggiunti, mantenendo la soluzione sotto agitazione magnetica, 0,2 ml di soluzione di preparato enzimatico Accelerase 1500 diluito 1:100. Sono stati poi effettuati prelievi inizialmente ogni 3 minuti per 10 minuti e poi ad intervalli più lunghi, fino a 200 minuti di reazione, per la determinazione degli zuccheri riducenti.

Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria cerealicola

Valutazione preliminare del trattamento enzimatico su paglia estrusa

Per valutare l'efficacia del trattamento enzimatico con Accelerase 1500 su campioni di paglia vengono pesati 13 grammi di paglia e frullati con un mixer per 1 minuto per ridurre la dimensione del sottoprodotto utilizzato prima di effettuare una sospensione in H₂O (1:20 p/v). Il campione sospeso in H₂O viene posto in autoclave a 121°C per 21 minuti. Circa la metà del solido autoclavato ottenuto viene macinato con un estrusore a coclea dotato di una lama a coltelli e un'aliquota pari a 5 gr di campione estruso viene sospeso nel liquido del trattamento in autoclave (1:5 p/v). Ad un'ulteriore aliquota del campione estruso pari a 5 gr. viene aggiunto Accelerase 1500 (5% v/p). Il campione con Accelerase 1500 e senza enzima sono posti in bagno termostato a 55°C e agitato periodicamente.

Ad intervalli regolari vengono effettuati prelievi sulla soluzione di reazione e per ogni aliquota viene effettuata la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (DNSA) del campione.

Trattamento termo-meccanico ed enzimatico su residui dell'industria enologica

Trattamenti termici, meccanici ed enzimatici combinati su raspi d'uva

La valutazione di diversi trattamenti su raspi d'uva conservati a diverse condizioni di temperatura è stata effettuata con 20 grammi di campione seccato in stufa a 60°C per 8 ore e risospeso in H₂O (1:10 p/v). Il campione sospeso in H₂O viene posto in autoclave a 121°C per 21 minuti. 5 gr di solido autoclavato viene risospeso in 25 ml del liquido di

sospensione in autoclave e un'altra aliquota pari a 5 gr di solido viene aggiunto Accelerase 1500 a diverse percentuali (1, 2,5 e 5% v/p). Una porzione del solido autoclavato ottenuto viene invece macinato con un estrusore a coclea dotato di una lama a coltelli e una vita senza fine. Un'aliquota pari a 5 gr di campione estruso viene sospeso nel liquido del trattamento in autoclave (1:5 p/v). Ad un'ulteriore aliquota del campione estruso pari a 5 gr. viene aggiunto Accelerase 1500 a diverse percentuali (1, 2,5 e 5% v/p). I campioni ottenuti con Accelerase 1500 e senza enzima sono posti in bagno termostato a 55°C e agitati periodicamente.

Ad intervalli regolari vengono effettuati prelievi sulla soluzione di reazione e per ogni aliquota viene effettuata la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (DNSA) del campione.

Attività idrolitica spontanea da microflora presente su graspi d'uva

La presenza di enzimi in grado di degradare la struttura lignocellulosica di graspi d'uva conservati a 4°C (GUII) e 37°C (GUIII) è stata effettuata mediante frullatura con mixer e risospensione in H₂O dei campioni presi in considerazione per l'estrazione di enzimi endogeni in fase acquosa. Viene utilizzata un'aliquota di GU II e GU III sottoposti a processo di estrazione in fase acquosa per ulteriore risospensione in H₂O distillata, ad altre aliquote di graspi viene aggiunto Accelerase 1500 al 2,5% v/p, per valutare l'effetto d'idrolisi di tale preparato enzimatico.

Ad intervalli regolari vengono effettuati prelievi sulla soluzione di reazione e per ogni aliquota prelevata viene effettuata la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (DNSA) del campione.

Coltura in fase sommersa di *Pleurotus ostreatus* e valutazione dell'attività laccasica

Coltura di *Pleurotus ostreatus* su terreno solido

Per la coltura del micelio fungino è stato utilizzato un ceppo del micelio di *Pleurotus ostreatus* cresciuto su semi di grano e commercializzato dall'Azienda Agricola Funghi Mara (Bologna) come prodotto umido per la coltivazione di funghi. Su piastra con terreno agarizzato sterilizzato in autoclave, costituito da 3 gr. di estratto di malto, 2 gr. di agar e 100 ml di H₂O distillata a pH 5,4 sono stati utilizzati 3 semi di grano per

effettuare l'inoculo del micelio. Le piastre sono state mantenute a temperatura di 37°C in assenza di luce e conservate a 4°C dopo il completo sviluppo su piastra del micelio fungino.

Coltura in fase sommersa di *Pleurotus ostreatus*

Si sterilizza in autoclave a 121°C per 21 minuti una beuta con frangiflutti e tappo di cotone con 5 gr. di estratto di malto, 2 gr. di glucosio in 200 ml di H₂O distillata. Dopo la sterilizzazione del terreno di coltura viene effettuato un inoculo con un disco della dimensione di 1 cm di micelio fungino cresciuto su terreno solido. Per stimolare la produzione di laccasi vengono aggiunti al terreno di coltura, in beute differenti, 5 gr. di raspi d'uva e 5 gr. di vinaccioli ed ogni beuta viene mantenuta in agitatore orbitale in assenza di luce a 100 rpm ed aerata ogni 12 ore per 14 giorni.

Ogni 24 ore vengono prelevate aliquote del terreno di coltura e per ogni aliquota prelevata viene effettuata la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti consumati nel terreno di coltura, tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (DNSA) del campione e la misura dell'attività laccasica.

Determinazione dell'attività laccasica

Per determinare l'attività laccasica è stato utilizzato il metodo di Setti et al.¹⁵⁶ basato sull'accoppiamento ossidativo tra il 3-metil 2-benzotiazolinone idrazone (MBTH) e l'orto-metossifenolo (guaiacolo Sigma). La reazione di accoppiamento ossidativo è mostrata in figura 3.5.

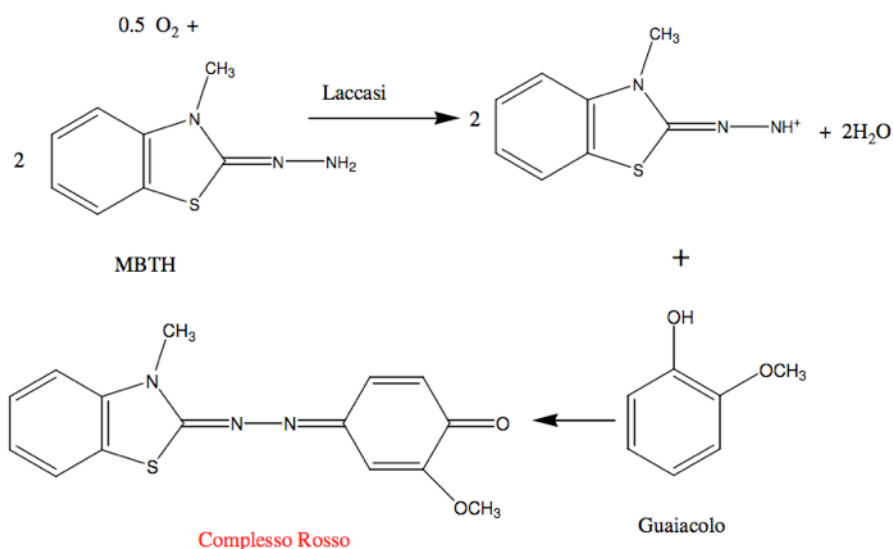


Fig 3.5 reazione di accoppiamento ossidativo tra MBTH e guaiacolo per la determinazione dell'attività laccasica.

I campioni sono preparati aggiungendo a 3 ml di tampone fosfato o fosfato-citrato 25 mM a pH 6,5, 500 μl di MBTH (Aldrich) 0.05% w/v, 50 μl di guaiacolo (Merck) 500 mM in etanolo (1.116 ml in 20 ml volume finale) e 300 μl di soluzione enzimatica (il bianco è preparato allo stesso modo, omettendo l'aggiunta di guaiacolo). I campioni sono incubati a 30 °C per 20 minuti. La reazione è fermata aggiungendo in rapida successione 500 μl di H_2SO_4 1 N e 1 ml d'acetone. Dopo centrifugazione i campioni sono letti a 502 nm contro il bianco e l'attività è calcolata con la formula:

Dove:

$\text{Abs}_{502\text{nm}}$: Assorbanza (502 nm) t = tempo di reazione in minuti

ϵ = coefficiente d'estinzione molare $8.355 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_{tot} = volume totale di reazione (ml) V_{enz} = volume di enzima aggiunto

Test d'idrolisi enzimatica residui dell'industria enologica e cerealicola dopo differenti pre-trattamenti

I campioni di vinacce e graspi sono stati conservati a -4 °C mentre quelli di paglia a temperatura ambiente in luogo asciutto.

I campioni vengono preliminarmente risospesi in acqua in rapporto variabile a seconda delle caratteristiche e del contenuto d'acqua del vegetale. I campioni di vinacce e graspi

sono stati risospesi in acqua in proporzione 1:3, il campione di paglia, matrice con un contenuto di umidità molto inferiore, è stata risospesa in proporzione 1:15.

Dopo la risospensione i campioni vengono sottoposti a frullatura con un mixer per 60 secondi al fine di ridurre le dimensioni dei solidi sospesi, ottenere un preparato più omogeneo e favorire i successivi step idrolitici. I campioni di graspi e paglia sono stati inseriti, dopo frullatura in becker, in bottiglie Duran da 250 ml nella proporzione 50 g di solido risospeso umido in 100 ml di liquido di risospensione.

Tutti i campioni sono stati poi sottoposti ad un trattamento termico di sterilizzazione in autoclave (121°C per 21'). Tale trattamento favorisce l'ingresso di acqua nelle maglie dei tessuti vegetali grazie alla gelificazione delle componenti polisaccaridiche facilitando i successivi processi di idrolisi enzimatica. Il processo di sterilizzazione consente inoltre di eliminare i fenomeni di fermentazione dovuti alla microflora batterica presente nei campioni. Tali fenomeni fermentativi non consentirebbero infatti di apprezzare gli effetti dell'idrolisi enzimatica monitorati analizzando il rilascio di zuccheri in soluzione.

I diversi campioni sono stati poi addizionati con preparati enzimatici commerciali secondo il metodo descritto da Di Gioia¹⁵⁷ ed aventi le attività idonee per aggredire le peculiari strutture polisaccaridiche che compongono i differenti tessuti vegetali. I preparati enzimatici sono stati aggiunti allo 0,5% p/p rispetto al solido da trattare.

- Vinacce: Pectinasi + Cellulasi
- Graspi: Cellulasi + Amilasi
- Paglia: Cellulasi + emicellulasi

I campioni vengono mantenuti sotto agitazione orbitale per 20 ore a 30°C.

Dopo ogni trattamento un aliquota del preparato viene prelevata per le analisi di Carboidrati Totali e Zuccheri Riducenti.

Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica^{158,159}. Il metodo è quindi basato su di una retta di taratura costruita con soluzioni standard di D(+)-glucosio alle concentrazioni comprese tra 0,01-0,1 mg/ml. A 200 µL di standard, posti in un tubo di reazione, si aggiungono 200 µL di soluzione acquosa di fenolo 5% p/v. Successivamente si aggiunge 1 ml di acido solforico conc. (98%p/p) e rapidamente si

chiude il tubo di reazione. Dopo una energica agitazione si lascia sviluppare la reazione per 30 min a 30°C e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco costituito da 200 μ L di H₂O distillata. Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce una retta di taratura.

La retta in figura 3.6 è stata costruita operando un raffreddamento a 30 °C dei campioni all'interno dei tubi ma come si può osservare tale operazione non garantisce la linearità che si è invece ottenuta effettuando il saggio senza un raffreddamento dei campioni (figura 3.7)

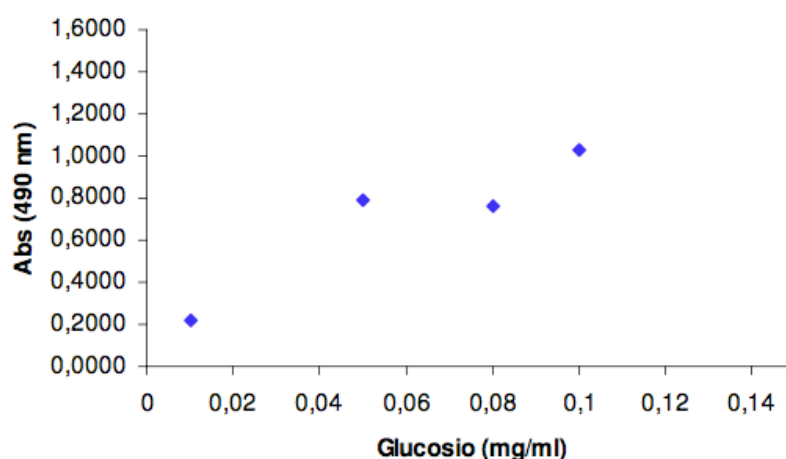


Fig 3.6 Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico e operando il raffreddamento a 30°C dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

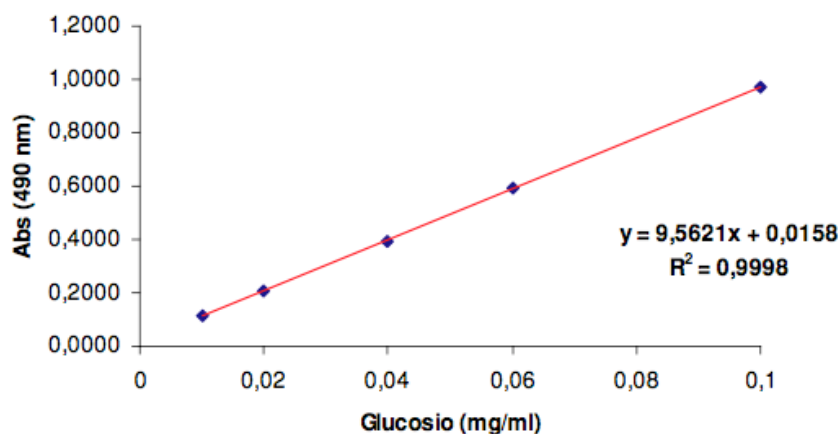


Fig 3.7 Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

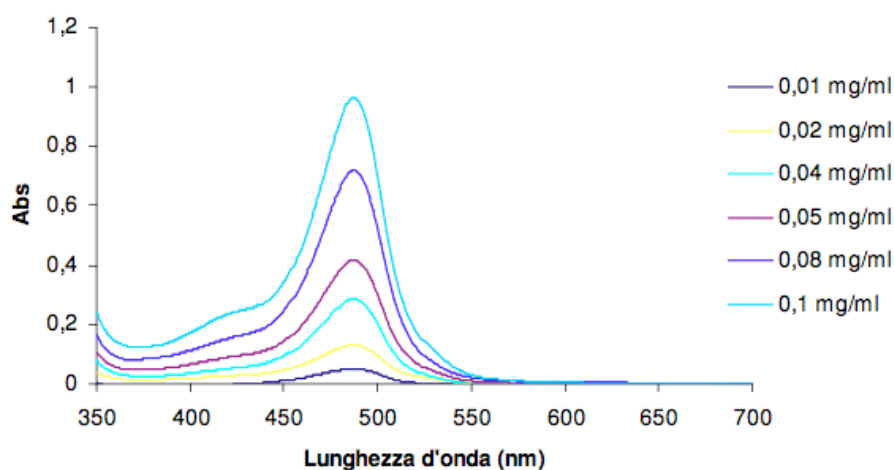


Fig 3.8 Spettri di assorbimento (350-700nm) dei campioni di standard trattati con il metodo fenolo/solforico.

Come si può osservare in figura 3.8 gli spettri di assorbimento dei campioni di standard di glucosio dopo il saggio fenolo/solforico hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 490 nm e inoltre si ha una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione di glucosio e ciò è in linea con i risultati ricercati in letteratura¹⁶⁰.

La retta di taratura di figura 3.7, relativa agli spettri di figura 3.8 , verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni di idrolizzati. Un'aliquota di estratto viene centrifugato e il surnatante, opportunamente diluito per ottenere concentrazioni rientranti nel range di linearità della retta di taratura, viene sottoposto al saggio nelle quantità di 200 µl.

Attraverso il saggio si hanno valori relativi alla quantità di carboidrati totali espressi come concentrazione di glucosio proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche.

Conservazione di graspi d'uva in condizioni anossiche

Le prove sperimentali di conservazione effettuate su graspi d'uva sono state effettuate su scarti produttivi della raccolta del 2010 di uva provenienti da Reggio Emilia.

La conservazione dei graspi d'uva in condizioni anossiche è avvenuta in contenitori cilindrici del diametro di 10 centimetri e altezza di 12 centimetri in cui sono stati inseriti quantità pari a 1.000 grammi di graspi sottoposti a diversi trattamenti. La prova sperimentale con *Lactobacillus buchneri* LN 40177 è stata effettuata mediante l'aggiunta di inoculo batterico commercializzato da Pioneer (*Lactobacillus buchneri* ceppo LN 40177, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, IA).

I graspi inseriti all'interno del contenitore cilindrico sono stati pressati mediante pressa idraulica con pressione pari a 2 kg/cm² di superficie e sigillati per consentire il mantenimento delle condizioni anossiche all'interno del contenitore.

Test di fermentazione su graspi d'uva sottoposti a conservazione anossica

I test di fermentazione sono stati condotti presso il Dipartimento di Produzione Vegetali dell'Università degli Studi di Milano con aliquote di graspi pari a 200 gr. e 2000 gr. di inoculo microbiologico standardizzato costituito da materiale in fermentazione proveniente da un impianto industriale. I fermentatori dopo l'incubazione di inoculo e substrato sono stati sigillati ermeticamente e posti in bagni termostatici a 40°C. La determinazione del contenuto in metano del biogas viene effettuata direttamente nello spazio di testa del fermentatore, attraverso appositi raccordi, posti sul tappo, con l'ausilio di analizzatore di gas Binder Combimass Ga-m3.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Forster, P., V. Ramaswamy, P. Artaxo et al.: Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2007
- ² Woodward, F.I., W. Cramer, A. Bondeau, I.C. Prentice et al. White. Dynamic responses of global terrestrial vegetation to changes in CO₂ and climate, *Global Change Biology*, 7, 357-373. 2001
- ³ Sandun F., Sushil A., Chauda C., and Naveen M. Biorefinery: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy&Fuels* 20, 1727-1737. 2006
- ⁴ Grassi G., Bridwater., Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe – A strategy for the future. Commission of the European Communities. 1990
- ⁵ S. Achterholt, H. Priefert, A. Steinbüchel, „Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 799-807. 2000
- ⁶ T. Ho Kim, C. Gi Han and C. Kun Song, “Instability of threshold voltage under constant bias stress in pentacene thin film transistors employing polyvinylphenol gate dielectric”, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1232-1236. 2008
- ⁷ E. Palmqvist, B. Hahn-Haagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74, 17-24, 2000
- ⁸ Hendriks A.T.W.M. , G. Zeeman. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18. 2009
- ⁹ C. Fabbri, M. Soldano, S. Piccini, 2011 *Informatore Agrario*. 26 2-6. 2011
- ¹⁰ Pain, B.F., Hephherd, R.Q.,. Anaerobic digestion of livestock wastes. In: Pain, B.F., Hephherd, R.Q. (Eds.), *Anaerobic Digestion of Farm Waste*. NIRD Technical Bulletins, Reading, 9–14. 1985
- ¹¹ D.P. Chynoweth, J.M. Owens, R. Legrand. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy* 22, 1-8, 2001
- ¹² Jodice R., Pin M. I biocarburanti: le filiere produttive, le tecnologie, i vantaggi ambientali e le prospettive di diffusione. 2007
- ¹³ E. Rychebosch, M. Drouillon, H. Vervaeren. Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and bioenergy* 35, 1633-1645. 2011

- ¹⁴ Persson, M., Jönsson, O., Wellinger, A. Biogas upgrading to vehicle fuel standards and grid injection. IEA Bioenergy, Task 37 – Energy from Biogas and Landfill Gas, 2006.
- ¹⁵ Born, J.,. From Sugar Factories to Biorefineries. Baltic Biorefinery Symposium, 23–32. ISBN: 87-7606-009-8. 2005
- ¹⁶ Kristensson, I. et al.,. Biogas pågasnätet utan propan tillsats. Rapport SGC 176, 1102-7371, ISRN SGC-R-176-SE, 6–18. 2007
- ¹⁷ Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A. and Domínguez- Espinosa R.. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS Biotechnol.* 22(9): 477-485. 2004
- ¹⁸ V.A.Vanilin, S.V. Rytov, L.Y. Lokshina. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*, 56(2-3), 229-237. 1996
- ¹⁹ Zhang B., He P.J., Lü F., Shao L.M. and Wang P.. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Res.* 41: 4468-4478. 2007
- ²⁰ W.T.M. Sanders, M.Geerink, G.Zeeman, G.Lettinga. Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrate. *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, June 15-18, Barcelona. 1999
- ²¹ Eastman J.A. and Ferguson J.F.. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *JWPCF* 53(3): 352-366. 1981
- ²² A.P Sinitsyn, A.V. Gusakov, E.Y. Vlasen. Effect of structural and physico- chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *App Biochem Biotechnol*, 30, 43-59. 1991
- ²³ D.N. Thompson, H.C. Chen, H.E. Grethlein. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Bioresour Technol*, 39,155-163.1992
- ²⁴ P.R. Chandra, A.R. Esteghlalian, Saddler JN: Assessing substrate accessibility to enzymatic hydrolysis by cellulases. In *Characteristics of lignocellulosic materials*. Edited by: Hu TQ. Oxford: Blackwell;60-80. 2008
- ²⁵ Mosey F.E.. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile fatty acids from glucose. *Water Sci. Technol.* 15: 209-232. 1983
- ²⁶ A.Husain. Mathematical models of the kinetics of anaerobic digestion. A selected review. *Biomass and Bioenergy*, 8 (6):433-444. 1998
- ²⁷ F.Malpei, D.Gardoni, La digestione anaerobica: i principi del processo biologico e i criteri di dimensionamento. 62° Corso di Aggiornamento biogas da frazioni organiche di rifiuti solidi urbani in miscela con altri substrati. 7-10 maggio, Milano. 2010

- ²⁸B.Schink. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2),262,260 1997
- ²⁹A.J.M. Stams, S.Oude Elferink, P.Westermann. Metabolic interaction between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Biomethanation I . Advances Engineering/ Biotechnology*. Volume 81,31-56, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2000
- ³⁰Boone D., Whitman W. and Rouviere P.. Diversity and taxonomy of methanogens. In Ferry J.G. (ed.) *Methanogenesis*. Chapman and Hall, New York, pp. 35–80. 1993
- ³¹Bryant M.P.. Microbial methane production – theoretical aspects. *J. Environ. Sci. Health A32*: 195-213. 1979
- ³²Metcalf and Eddy. *Wastewater Engineering. Treatment, Disposal, Reuse*. 3rd edition, McGraw-Hill Int. Ed.,Singapore. 1991
- ³³J.A. Oleszkiewicz, V.K.Sharma. Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metal. *Biological wastes*, 21, 45-67. 1990
- ³⁴Oremland R.S.. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In Zehnder A.J.B. (ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, pp. 641-706. 1988
- ³⁵Wellinger, Baserga, U., Edelmann et al.. *Biogas-Handbuch: Grndlagen'-elanung - Betrieb - Landwirtschaftliche Anlagen*, 2. Auflage, Wirz-Verlag, Aarau. 1991
- ³⁶G.E.Symons, A.M Buswell. The methane fermentation of Carbohydrates. *J.Am. Chem. Soc.* 55, 2028-2036. 1932
- ³⁷Fengel, D., Wegener, G.Wood: *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter, Berlin. 1984
- ³⁸Crawford D.L.. *Lignin biodegradation and transformation*. Wiley- Interscience, New York. 1981
- ³⁹Sun, Y. and J. Cheng. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review." *Bioresource Technology* 83(1): 1-11. 2002
- ⁴⁰*Biomass Characteristic,Biomass Gasification and Pyrolysis*, Pages 27-63. Prabir Basu.2010
- ⁴¹Himmel M.E., Ruth M.F. and Wyman C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(4): 358-64.1999
- ⁴²Nishiyama Y., Langan P. and Chanzy H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose Ibeta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124(31): 9074-9082. 2002

- ⁴³ Ding S.Y. and Himmel M.E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J. Agric. Food Chem.* 54(3): 597-606. 2006
- ⁴⁴ Himmel M. E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W. and Foust T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315(5813): 804 – 807. 2007
- ⁴⁵ Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W., Wyman, C.E. Xylose fermentation: an economic analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 20/21, 391–410. 1989
- ⁴⁶ Ho, N.W.Y., Chen, Z., Brainard, A.,. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective co-fermentation of glucose and xylose. *Applied Environmental Microbiology* 64, 1852–1859. 1998
- ⁴⁷ Sreenath, H.K., Jeffries, T.W.,. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology* 72, 253–260. 2000
- ⁴⁸ Lynd, L.R., Elander, R.T., Wyman, C.E.,. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58, 741–761. 1996
- ⁴⁹ Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., Tsao, G.T.,. Process considerations in enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 82–102. 1983
- ⁵⁰ Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Gir, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., et al.,. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels Bioprod. Biorefining.* 4, 77–93. 2010
- ⁵¹ Yang, B., Wyman, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Biop. Biorefining*, 2, 26–40. 2008
- ⁵² Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E.,. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 1081–1099. 2005
- ⁵³ Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N.,. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 108, 67–93. 2007
- ⁵⁴ Sun, Y., Cheng, J.,. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol* 83, 1–11. 2002
- ⁵⁵ Karunanithy, C., Muthukumarappan, K.,. Effect of Extruder Parameters and Moisture Content of Switchgrass, Prairie Cord Grass on Sugar Recovery from Enzymatic Hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* doi: 10.1007/ s12010-010-8959-3. 2010
- ⁵⁶ Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Julson, J.L.,. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated in high shear bioreactor. *Am. Soc. Agric. Biol. Eng. Ann. Int. Meet.* 6, 3603–3611. 2008

- ⁵⁷ Sun, R.C., Tomkinson, R.C.,. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 50 (3), 263–271. 2002
- ⁵⁸ Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., Lambert, A.,. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *J. Biobased Mater. Bioenergy.* 3, 25–31. 2009
- ⁵⁹ Bobleter, O.,. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* 19, 797–841. 1994
- ⁶⁰ Bobleter, O., Concin, R.,. Degradation of poplar lignin by hydrothermal treatment. *Cellulose Chemistry and Technology* 13, 583–593. 1979
- ⁶¹ Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst.* 57, 191–202. 1999
- ⁶² Gregg, D., Saddler, J.N.,. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 711–727. 1996
- ⁶³ Cara, C., Romero, I., Oliva, J.M., Sàez, F., Castro, E. Liquid hot water of olive tree pruning residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136-140, 379–394. 2007
- ⁶⁴ Gossett, J.M., Stuckey, D.C., Owen, W.F., Mccarty, P.L., Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. *J. Environ. Eng. Div.* 108, 437–454. 1982
- ⁶⁵ Lora, J.H., Wayman, M.,. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. *Tappi* 61, 47–50. 1978
- ⁶⁶ Negro, M.J., Manzanares, P., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Ballesteros, M. Changes in various physical chemical parameters of *Pinus Pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass Bioenergy* 25, 301–308. 2003
- ⁶⁷ Mosier, N., Wyman, C.E., Dale, B.D., Elander, R.T., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., et al.,. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686. 2005
- ⁶⁸ Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Girio, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849–864. 2008
- ⁶⁹ Gossett, J.M., Stuckey, D.C., Owen, W.F., Mccarty, P.L. Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. *J. Environ. Eng. Div.* 108, 437–454. 1982
- ⁷⁰ Gregg, D., Saddler, J.N. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 711–727. 1996
- ⁷¹ Keller, F.A., Hamilton, J., Nguyen, Q.A.,. Microbial pretreatment of biomass. *Appl. Biotechnol. Bioeng.* 105, 27–41. 2003

- ⁷² Rowena T. Romano, Ruihong Zhang, S. T. J. A. M. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass Bioresource Technology, 100, 4564-4571. 2009
- ⁷³ R. Singh Jayani, S. Saxena, R. Gupta, "Microbial pectinolytic enzymes: A review", Process Biochemistry, 40 2931–2944. 2005
- ⁷⁴ Messerschmidt A. and Huber R.. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Eur J Biochem 187, 341-352. 1990
- ⁷⁵ Mayer A.M. and Staples R.C.- Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60: 551-565. 2002
- ⁷⁶ Hopkins T.L. and Kramer K.J.. Insect cuticle sclerotization. - Annu. Rev. Entomol. 37, 273-302. 1992
- ⁷⁷ Susana Rodríguez Couto, J. L. T.-H. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi Biotechnology Advances,, 25, 558–569. 2007
- ⁷⁸ Brown R.R.,. Biochemical aspect of oxidative coupling of phenols. Oxidative Coupling of Phenols, New York, Marcel Dekker, 167-201. 1967
- ⁷⁹ Higuchi T.,. Mechanism of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In: Lewis, N.G., and Paice M.G., (Eds), Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Polymers. ACS Symposium Series, 399, 482-502. 1989
- ⁸⁰ Haars A., Chet I., Hüttermann A.,. Effects of phenolic compounds and tannin on growth and activity of Fomes annosus. Environmental Journal of Forest Pathology, 11, 67-76. 1981
- ⁸¹ Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., and Sannia G.. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 920-924. 2000
- ⁸² M.D. Cameron, S. Timofeevski, S.D. Aust; Appl Microbiol Biotechnol., 54: pp. 751-758. 2000
- ⁸³ Sanchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol. Adv. 27, 185–194. 2009
- ⁸⁴ Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind. Eng. Chem. Res. 48, 3713–3729. 2009
- ⁸⁵ Shi, J., Sharma-Shivappa, R.R., Chinn, M., Howell, N.. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. Biomass Bioenerg. 33, 88–96. 2009
- ⁸⁶ Jeffries T.W.. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. Biodegradation, 1, 163-176. 1990

- ⁸⁷ U. Tuor, K. Winterhalter, A. Fiechte. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants in wood decay. *Journal of Biotechnology*. Volume 41, 15,1–17. 1995
- ⁸⁸ Ander P., Eriksson K.E.,. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Plant Physiology*, 41, 239-248. 1980
- ⁸⁹ Galliano H., Gas G., Series J.L., Boundet A.M.,. Lignin degradation by *Rigidosporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn- peroxidase and laccase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 473-482. 1991
- ⁹⁰ Giovannozzi Sermanni G., D'Annibale A., Di Lena G., Vitale N.S., Di Mattia E., Minelli V.. The production of exoenzymes of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Biosource Technology*, 48, 173-178. 1994
- ⁹¹ Kim, S., & Dale, B. E.. *Biomass Bioenergy*, 26, 361–375. 2004
- ⁹² Alexander Bauera, Peter Böschb. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142, 50–55. 2009
- ⁹³ Craig B. Faulds, “Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues”, PhD Thesis, University of East Anglia, 1997
- ⁹⁴ De Rosa T., Castagner R. *Tecnologie della grappa e dei distillati d'uva*. Edizioni Edagricole, Bologna. 1994
- ⁹⁵ ANPA/ONR, Primo rapporto sui Rifiuti Speciali. In: *Stima della produzione di rifiuti speciali di alcuni comparti industriali attraverso studi di settore*, 88-111. 1999
- ⁹⁶ J. Ellenrieder, D.Schieder, W. Mayer. M. Faulstich. Combined mechanical enzymatic pretreatment for an improved substrate conversion when fermenting biogenic resources. *Engineering in Life Science*, 10, 544-551. 2010
- ⁹⁷ Maibritt Hjorth, Kay Gränitz, et al. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. *Bioresource Technology*, 102, 4889-4994. 2011
- ⁹⁸ Alexander Bauera, Peter Böschb,. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142, 50–55. 2009
- ⁹⁹ Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W., Wyman, C.E. Xylose fermentation: an economic analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 20/21, 391–410. 1989
- ¹⁰⁰ Sreenath, H.K., Jeffries, T.W.. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology* 72, 253–260. 2000
- ¹⁰¹ Hsu, T.A., Ladisch, M.R., Tsao, G.T. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology* 10 (5), 315–319. 1980

- ¹⁰² Georgieva, T. I.; Hou, X.; Hilstrøm, T. & Ahring, B. K. Enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of high dry matter wet-exploded wheat straw at low enzyme loading. *Appl Biochem Biotechnol*, BioScience and Technology Group, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Building 227, 2800, Lyngby, Denmark. 148, 35-44. 2008
- ¹⁰³ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., “Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity”, *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270. 1992
- ¹⁰⁴ E.-M. Dilsterhiift, V. A. J. M. Linssen, A. G. J. V. & Beldman, G. Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme Microbial Technology*, 20, 437-445. 1997
- ¹⁰⁵ Wood, T. M., & Bhat, K. M., “Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*”, 160, 87–112. 1988
- ¹⁰⁶ D.S. Chahal, S. McGuire, H. Pikor, G. Noble. Production of cellulase complex by *Trichoderma reesei* rut-C30 on lignocellulose and its hydrolytic potential. *Biomass*, 2, pp.127-137. 1982
- ¹⁰⁷ M.Gritzali, R.D.Brown Jr., The cellulase system of *Trichoderma*. The relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose grown cells, *Adv. Chem. Ser.* 181, 237–260. 1979
- ¹⁰⁸ J.P.H van Wyk. Hydrolysis of pretreated paper materials by different concentrations of cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Bioresource Technology*. 69, 269–273, 1999
- ¹⁰⁹ A.V. Joglekar, M.C. Srinivasan, A.C. Manchanda, V.V. Jogdand, N.G. Karanth. Studies on cellulase production by a *Penicillium funiculosum* strain in an instrumented fermenter. *Enzyme and Microbial Technology* Volume 5, 22–24 1983
- ¹¹⁰ J.P.H. van Wyk. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass and Bioenergy*. 16, 239–242. 1999
- ¹¹¹ Iwona Cybulska, H. L. & Julson, J. Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Prairie Cord Grass. *Energy Fuels*, 24, 718-727. 2010
- ¹¹² Berovic, M. Sterilisation in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 11, 1387-2656. 2005
- ¹¹³ Giorgia Spigno, Tiziana Pizzorno, D. M. D. F. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, 99, 4329–4337. 2008
- ¹¹⁴ E. Bertran, X. Sort, M. S. I. T. Composting winery waste: sludges and grape stalks *Bioresource Technology*, 95, 203-208. 2004
- ¹¹⁵ E. Dinuccio, P. Balsari, et al. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technology*, 101, 3780–3783. 2010

- ¹¹⁷ Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones D.L. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources, *Bioresource Technology*, 99, 17, 7928-7940. 2008
- ¹¹⁸ Lynd, L.R., Elander, R.T., Wyman, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58, 741–761. 1996
- ¹¹⁹ Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C.. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst.* 57, 191–202. 1999
- ¹²⁰ Bobleter, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19, 797–841. 1994
- ¹²¹ Iwona Cybulska, H. L. & Julson, J. Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Prairie Cord Grass. *Energy Fuels*, 24, 718-727. 2010
- ¹²² Palmowski, L., Muller, J. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona 15–17 June, pp. 137–144. 1999
- ¹²³ Anthony Mshandete, Lovisa Bjornsson, et al. M. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy*, 31, 2385–2392. 2006
- ¹²⁴ Sinitsyn AP, Gusakov AV, Vlasen EY: Effect of structural and physico- chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *App Biochem Biotechnol*, 30:43-59. 1991
- ¹²⁵ Chandra PR, Esteghlalian AR, Saddler JN: Assessing substrate accessibility to enzymatic hydrolysis by cellulases. In *Characteristics of lignocellulosic materials*. Edited by: Hu TQ. Oxford: Blackwell, 60-80. 2008
- ¹²⁶ Esterbauer H, Steined W, Labudova I, Herman A, Hayn M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol* 36:51–65. 1991
- ¹²⁷ Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185-194. 2009
- ¹²⁸ Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol*, 2:602–19. 2003
- ¹²⁹ Martinez G, Larrondo N, Putman N, Gelpke MDS, Huang K, Chapman J, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnol*; 22:1–6. 2004
- ¹³⁰ Weizhang Zhong, Zhongzhi Zhang, W. Q. P. F. M. L. Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion. *Renewable Energy*, 36, 1875-1879. 2011
- ¹³¹ H. Morais, C. Ramos, E. F. A. J. & Cserhati, T. Enzyme Production of *Pleurotus ostreatus* Evaluated by the Three-Way Principal Component Analysis. *Engineering in Life Science*, 2, 165-170. 2004

- ¹³² Lihua Liua, Zhiwei Lin et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 426-433. 2009
- ¹³³ P.R. Giardina, L. Cannio, L. Martirani, G. Marzullo, G. Palmiari, G. Sannis, Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin- degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol*, 61, 2408-2413. 1995
- ¹³⁴ L. Marzullo, R. Cannio, P. Giardina, M. T. Santini, G. Sannia, Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidised substrates, *J. Biol. Chem*, 270, 3823-3827. 1995
- ¹³⁵ L. Bezalet, Y. Hadar, C. E. Cerniglia, Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol*, 63, 2495-2501. 1997
- ¹³⁶ S. Kurashige, Y. Akuzawa, F. Endo, Effect of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butanolnitrosamine, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 192, 175-183. 1997
- ¹³⁷ K-S. Shin, I-K. Oh, C-J. Kim, Production and purification of Remazol brilliant blue R decolourising peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol*, 63, 2495-2501. 1997
- ¹³⁸ M. Lorenzo, D. Moldes, S. R. A. S. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes Versicolor*. *Bioresource Technology*, 82, 109-113. 2002
- ¹³⁹ Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P.G., "Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazine and methoxyphenols", *Enzyme and microbial technology*, 25, 258-289, 1999
- ¹⁴⁰ D. Moldes, P.P. Gallego, S. Rodriguez Couto, A. Sanroma. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 25: 491-495, 2003.
- ¹⁴¹ S. Rodriguez Couto, E. Lopez, M. Angeles Sanroma. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering* 74, 263-267, 2006
- ¹⁴² Ough, C.S., Crowell, E.A. Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science* 52, 386-389. 1987
- ¹⁴³ Beck TH. The microbiology of silage fermentation, in *Fermentation of silage*. National Feed Ingredients Association, Des Moines. Iowa 61-115. 1978
- ¹⁴⁴ R.J. Lambert and M. Stratford. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 157-164. 1999

- ¹⁴⁵ Moon, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate, and their synergistic mixture. *J. Appl. Bacteriol.* 55:453–460. 1983
- ¹⁴⁶ Michaela Holzer, Elisabeth Mayrhuber, H. D. & Braun, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21, 282-287. 2003
- ¹⁴⁷ S. Oude Elferink, J. Krooneman, J. C. Gottschal, . S. F. Spoelstra et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Biotechnology*, Vol. 67, No. 1, p. 125–132. 2001
- ¹⁴⁸ E. Tabacco, S. Piano, A. Revello-Chion, and G. Borreani. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94:5589–5598. 2011
- ¹⁴⁹ V.L. Nsereko, Brenda K. Smiley, W. M. Rutherford. et al. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber *Animal Feed Science and Technology*, 145, 122-135. 2008
- ¹⁵⁰ Williamson, G., Kroon, P.A., Faulds, C.B. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144, 2011–2023. 1998
- ¹⁵¹ Bartolome, B., C.B. Faulds, P.A. Kroon, K. Waldron, H.J. Gilbert, G. Hazlewood and G. Williamson. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp *cellulosa* esterase (XylD) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl. Envmtal. Microbiol.* 63(1):20a8-212. 1997
- ¹⁵² Krueger, N.A. and A.T. Adesogan. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, In Press. 2008
- ¹⁵³ Krueger, N.A., A.T. Adesogan, C.R. Staples, W.K. Krueger, D.B. Dean and R.C. Littell. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation *Anim. Feed. Sci. Technol.*, In Press. 2008
- ¹⁵⁴ Eun, J.S. and K A. Beauchemin. Supplementation with combinations of exogenous enzymes: Effects on in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. Final report to Dyadic International Inc. Agriculture and Agrifood Canada, Research Centre Report, Lethbridge, Canada. 15pp. 2006
- ¹⁵⁵ Yu, P., J.J. McKinnon and D.A. Christensen. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multienzyme cocktail: In vitro studies. *J. Anim. Sci.* 83:1133-1141. 2005
- ¹⁵⁶ Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P.G., “Laccase catalyzed-oxidative copuling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hidrazone and methoxyphenols”, *Enzyme and microbial tecnology*, 25, 258-289. 1999

- ¹⁵⁷ D.DiGioia, L.Sciubba,L.Setti,F.Luziatelli,M.Ruzzi,D. Zanichelli,F.Fava. Production of biovanillin from wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology* 41. 498–505. 2007
- ¹⁵⁸ Chaplin M.F., Kennedy J.F., *Colorimetric assay, Carbohydrate analysis* , 1986
- ¹⁵⁹ Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M, Cardilli D., Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples, *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 219-223. 2002
- ¹⁶⁰ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, Division of Biochemistry, University of Minnesota